

**Die Wirkung von D-Aminosäuren
auf die Biosynthese des Mureins**

Bernhard Trippen

1973





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554604_0070

Die Wirkung von D-Aminosäuren auf
die Biosynthese des Mureins

Von der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München angenommene Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt

von

Bernhard Trippen

aus

Bad Berleburg / Nordrhein-Westfalen

Februar 1973



1. Berichterstatter Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter Prof. Dr. K.H. Schleifer

Tag der Einreichung der Arbeit : 9.2.1973
Tag der mündlichen Prüfung : 19.3.1973

Vorliegende Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Professor Dr. O. Kandler von 1970 - 1973 angefertigt.

Herrn Professor Kandler danke ich für das große Interesse an meiner Arbeit und für alle persönlichen Anregungen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. K. H. Schleifer für seine stete Anteilnahme an meiner Arbeit.

Frau L. Hagner danke ich für ihre sorgfältige Assistenz.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1. Organismen	5
2.2. Nährmedien	5
2.3. Kulturbedingungen und Anzucht	6
2.4. Gewinnung der Zellwände	7
2.5. Reinigung der durch tryptische Verdauung gereinigten Zellwände mit Natriumdodecyl- sulfat	8
2.6. Hydrolysebedingungen	8
2.6.1. Totalhydrolyse	8
2.6.2. Partialhydrolyse	9
2.6.3. Alkalische Partialhydrolyse	9
2.7. Papier- und Dünnschichtchromatographie	10
2.7.1. Aminosäuren, Aminosucker und Peptide	10
2.7.2. DNP-Aminosäuren	11
2.8. Präparative Chromatographie	12
2.8.1. Präparative Papierchromatographie zur Isolierung von Peptiden aus Zellwand- hydrolysaten	12
2.8.2. Präparative Papierchromatographie zur Isolierung von nukleotidaktivierten Mureinvorstufen	12
2.8.3. Präparative Dünnschicht- und Papier- chromatographie zur Isolierung von DNP-Aminosäuren	13
2.9. Dinitrophenylierung	14
2.9.1. Dinitrophenylierung von Zellwänden	14
2.9.2. Dinitrophenylierung von Peptiden	14
2.9.3. Dinitrophenylierung von freien Amino- säuren	15
2.10. Quantitative Bestimmung des Gehaltes an dinitrophenylierbaren Aminosäuren	15
2.11. Quantitative Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren	16

	Seite
2.11.1. Herstellung von wasserfreiem Hydrazin	16
2.11.2. Hydrazinolyse	16
2.12. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren Aminozuckern und Ammoniak	17
2.13. Quantitative Bestimmung von Methionin	17
2.14. Bestimmung der Konfiguration von Amino- säuren	18
2.15. Bestimmung des N-Acetylglucosamingehaltes	19
2.16. Untersuchung der Empfindlichkeit der Orga- nismen gegenüber D-Aminosäuren	20
2.17. Isolierung von nukleotidaktivierten Murein- vorstufen	20
2.18. Sephadex-Gelfiltration	21
 3. Ergebnisse	 22
3.1. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von <i>Corynebacterium callunae</i>	22
3.1.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen	24
3.1.2. Untersuchung der unter D-Serineinfluß angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen	29
3.2. Die Wirkung von weiteren D-Aminosäuren auf das Murein von <i>Corynebacterium callunae</i>	35
3.2.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen	35
3.2.2. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen (2.5% D-Threonin)	37
3.2.3. Die Wirkung von D-Leucin auf das Murein von <i>C. callunae</i>	39
3.2.4. Der Einfluß von D-Valin auf das Murein von <i>C. callunae</i>	42
3.2.5. Der Einfluß von D-Methionin auf das Murein von <i>C. callunae</i>	44

	Seite
3.3. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von <i>Bacillus subtilis</i>	46
3.3.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen	46
3.3.2. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen	48
3.3.3. Der Einfluß von D-Threonin, D-Valin und D-Leucin auf das Murein von <i>B. subtilis</i>	50
3.4. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von <i>Arthrobacter spec.</i>	52
3.5. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von <i>L. plantarum</i>	54
3.5.1. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen	55
3.6. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von <i>Lactobacillus cellobiosus</i>	58
3.6.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen	59
3.6.2. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen	61
3.7. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von <i>Staphylococcus</i> Stamm Copenhagen	63
3.7.1. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen	65
3.8. Der Einfluß von D-Serin auf das Murein von <i>Corynebacterium insidiosum</i>	68
3.9. Der Einfluß von D-Serin auf das Murein von <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72
3.9.1. Der Einfluß von weiteren D-Aminosäuren auf das Murein von <i>M. lysodeikticus</i>	75
3.9.2. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen	77

	Seite
3.9.3. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen	81
3.9.4. Untersuchung der unter dem Einfluß von Penicillin angereicherten Mureinvorstufen	84
4. Diskussion	87
5. Zusammenfassung	95
6. Literaturverzeichnis	97

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UDP	Uridin-5'-diphosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
MurNac	=M= N-Acetylmuraminsäure
GlcNac	=G= N-Acetyl-D-Glucosamin
Mur	Muraminsäure
GlcNH ₂	D-Glucosamin
Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
DAB	2,4,-Diaminobuttersäure
Dpm	Diaminopimelinsäure
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Orn	Ornithin
Thr	Threonin
Val	Valin
DNP	2,4,-Dinitrophenyl
SDS	Mit Natriumdodecylsulfat behandelt
TES	Trichloressigsäure
ZW	Zellwand
-TRYP	tryptisch gereinigt

1. Einleitung

Eine wachstumshemmende Wirkung von D-Aminosäuren auf Bakterien wurde 1944 zum ersten Mal beschrieben. Fox, Fling und Bollenbeck (1944) stellten bei *Lactobacillus arabinosus* eine Wachstumshemmung durch D-Leucin fest. Zur selben Zeit wurde auch die wachstumshemmende Wirkung von Glycin entdeckt. Snell und Guirard (1943) stellten sie bei *Lactobacillen* und Gordon und Gordon (1943) bei Vibrionen fest. Die Untersuchungen wurden bald mit anderen Organismen und weiteren D-Aminosäuren durchgeführt. Kobayashi, Fling und Fox (1947) fanden, daß auch *E. coli* und *Staphylococcus aureus* durch D-Alanin, D-Valin und D-Leucin im Wachstum gehemmt werden. Außerdem beobachteten sie, daß die wachstumshemmende Wirkung, die durch die Racemate der Aminosäuren verursacht wird, auf das unnatürliche D-Isomere zurückzuführen ist.

Dubos (1949) fand, daß sich DL-Serin und DL-Alanin für *Mycobacterium tuberculosis* als toxisch erweisen. Auch hier wurde für die Wirkung das D-Isomere verantwortlich gemacht.

Yaw und Kakavas (1957) führten weitere Untersuchungen mit D-Aminosäuren und Racematen bei *Brucella abortus* durch. D-Phenylalanin und D-Methionin hatten dabei die größte wachstumshemmende Wirkung.

Gula (1960) untersuchte die Wirkung von D-Aminosäuren bei einer Species von *Erwinia*. Erhöhte Mengen an D-Aminosäuren führten bei diesen Untersuchungen zu vollständiger Wachstumshemmung.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Lark und Lark (1960) bei *Alcaligenes faecalis*. Vergleichende Untersuchungen von Hishinuma, Izaki und Takahashi (1969) ergaben bei verschiedenen Stämmen der einzelnen Art gleiche, bei solchen verschiedener Arten jedoch unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Glycin und D-Aminosäuren.

Bakterien, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Glycin besaßen, waren auch widerstandsfähiger gegenüber D-Aminosäuren. Whitney und Grula (1968) beschrieben den Einbau von D-Serin in die Zellwand von *Micrococcus lysodeikticus* und Lark et al. (1963) den Einbau von D-Methionin in das Murein von *Alcaligenes faecalis*. Die genaue Lokalisierung der eingebauten Aminosäure unterblieb jedoch in beiden Arbeiten.

Schon früh stellte man fest, daß D-Aminosäuren ähnliche morphologische Veränderungen wie D-Cycloserin und Penicillin hervorrufen. Diese Wirkungen sind gekennzeichnet durch Lyse im hypotonischen Bereich und durch Späroplastenbildung und L-Formenbildung im isotonischen Bereich. (Snell und Guirard 1943, Kobayashi et al. 1948, Dienes et al. 1950, Dienes und Zamacneik 1952, Tuttle und Gest 1959, Welsch 1958, Welsch und Osterrieth 1958).

Aus diesen Übereinstimmungen ließ sich folgern, daß Penicillin, Glycin und D-Aminosäuren einen gemeinsamen Angriffspunkt haben. Es wurde vermutet, daß sich die Schädigungen, die durch Glycin und D-Aminosäuren erfolgen, auf chemische Veränderungen im Murein beziehen, denn dieses ist ja für die Gestalt und die osmotische Stabilität der Zellen verantwortlich.

Park (1958) konnte eine weitere Gemeinsamkeit zwischen der Penicillin- und Glycinwirkung feststellen. Er fand, daß bei *Staphylococcus aureus* unter dem Einfluß von Glycin Uridinphosphat-Aminozucker angereichert werden. Eine Anreicherung von nukleotidaktivierten Mureinvorstufen durch Glycin konnte von Fung und Winter (1968) auch bei *Vibrio fetus* nachgewiesen werden.

Strominger und Birge (1965) untersuchten erstmalig die Struktur der unter Glycineinfluß gebildeten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen. Die gefundenen UDP-N-Acetylmuramyl-derivate waren:

UDP-MurNac, UDP-MurNac-Ala-Glu-Lys, UDP-MurNac-Gly-Glu-Lys und UDP-MurNac-Gly-Glu-Lys-D-Ala-D-Ala. Die Verbindung UDP-MurNac wurde am stärksten angereichert. Die morphologischen Veränderungen und das verstärkte Auftreten von UDP-MurNac wurde von den Autoren durch die Hemmung der UDP-MurNac : L-Alanin Ligase (das L-Alanin einbauende Enzym) erklärt. Ob Glycin auch in die Zellwand eingebaut wird, wurde von den Autoren nicht untersucht.

Von Haimerl (1970) konnte geklärt werden, daß Glycin auch in das Murein von glycingehemmten Zellen von *Staphylococcus aureus* eingebaut wird. Im Chromatogramm eines sauren Partialhydrolysates konnte das Peptid Gly-Glu gefunden werden. Dieses Peptid konnte auch von Stern (1970) im Murein von *Lactobacillus cellobiosus* und von *Lactobacillus coryneformis* gefunden werden. Es wurde weiter gezeigt, daß der Glycineinbau von einer verminderten Quervernetzung begleitet war. Bei der weiteren Untersuchung des Mureins von glycingehemmten Zellen von *Lactobacillus cellobiosus* ergab sich jedoch, daß die Summe von L-Alanin und Glycin den Wert für Glutaminsäure beträchtlich übersteigt. Daher blieb die Frage offen, ob Glycin noch in andere Positionen der Peptiduntereinheit eingebaut werden kann, als in die Position 1, die normalerweise L-Alanin einnimmt. Ein Einbau an Stelle von D-Glutaminsäure oder von L-Lysin (bzw. L-Ornithin) mußte ausgeschlossen werden, da das Verhältnis dieser Aminosäuren zu Muraminsäure konstant blieb. Betrachtet man Glycin jedoch als D-Alaninanalogue, so kann ein Ersatz von D-Alanin in Position 4 der Peptiduntereinheit nicht ausgeschlossen werden.

Dies mußte vor allem für coryneforme Organismen angenommen werden, deren Murein in Position 1 der Peptiduntereinheit ohnehin Glycin an Stelle von L-Alanin enthält. Auch diese Organismen (Stern 1970) waren hochempfindlich gegenüber Glycin und zeigten ebenfalls morphologische Veränderungen. Da hier die Wirkung von Glycin als L-Alaninanalogue entfällt, mußten die Veränderungen im Murein auf die Wirkung von Glycin als D-Alaninanalogue zurückgeführt werden.

Gegen diese Überlegungen sprechen jedoch die Untersuchungen von Neuhaus (1962) und von Neuhaus und Struve (1965). Bei ihren enzymatischen in-vitro Untersuchungen zeigten sie, daß die D-Alanin-D-Alanin Synthetase und die UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-L-Lys : D-Ala-D-Ala Ligase bei *Streptococcus faecalis* eine komplementäre Spezifität aufweisen. So konnten unter dem Einfluß von Glycin und von D-Aminosäuren nur Dipeptide mit N-terminalem Alanin isoliert werden (z. B.: D-Ala-Gly, D-Ala-D-Ser, D-Ala-D-Thr, D-Ala-D-Norval, D-Ala-D-ABS). Peptide vom Typ Gly-Gly oder D-Ser-D-Ser und Dipeptide mit umgekehrter Sequenz konnten nicht gefunden werden.

Die UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-L-Lys : D-Ala-D-Ala Ligase hingegen diskriminiert alle Dipeptide, die nicht D-Alanin in C-terminaler Position besitzen (z. B. D-Ala-Gly, D-Ala-D-Ser etc.).

Kürzlich konnte von Hammes gezeigt werden (Dissertation 1972), daß Glycin das D-Alanin im Murein ersetzt und daß glycinhaltige Mureinvorstufen vom Einbau und insbesondere von der Quervernetzung der Peptiduntereinheiten diskriminiert werden. Nur bei einigen Organismen kann Glycin auch das L-Alanin in Position 1 der Peptiduntereinheit ersetzen. Hierdurch werden die "D-Aminosäureeffekte" verstärkt.

Die Vorstellung, daß auch D-Aminosäuren das D-Alanin in Position 4 oder 5 der Peptiduntereinheit ersetzen können und zur Verminderung der Quervernetzungsrates führen, war die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Die untersuchten Organismen und ihre Herkunft sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Gattung	Species	Herkunft	Stammbezeichnung
Lactobacillus	cellobiosus	ATCC	11 739
	plantarum	NIZO	3 610
Arthrobacter	spec.	Eigenisolat	
Corynebacterium	insidiosum	ATCC	10 253
	callunae	ATCC	15 991
Bacillus	subtilis	Archibald	W 23
Staphylococcus	aureus	Strominger	Copenhagen
Micrococcus	lysodeiktikus	ATCC	12 698

Tab. 1

Untersuchte Organismen und ihre Herkunft

ATCC	= American Type Culture Collection, Rockville Maryland, USA
NIZO	= Ned. Institut voor Zuivelonderzoek
Archibald	= Prof. A. R. Archibald, University of Newcastle upon Tyne, G. B.
Strominger	= Prof. J. L. Strominger, University of Wisconsin Medical Scholl, Madison, USA

2.2. Nährmedien

Hefe-Dextrose-Nährboden (HD-Medium)

Casein Pepton (Merck)	10 g/l
Hefeextrakt (Cenovis)	5 g/l
D-Glucose	5 g/l

Kochsalz 5 g/l
dest. Wasser, pH 7.4 - 7.6

MRS-Medium (De Man et al. 1968)

Casein Pepton (Merck)	10 g/l
Fleischextrakt (Liebig)	2 g/l
Hefeextrakt (Cenovis)	5 g/l
D-Glucose	20 g/l
Tween 80	1ml/l
K_2HPO_4	2 g/l
Na-acetat x 3 H_2O	5 g/l
Diammoniumcitrat	2 g/l
$MgSO_4$ x 7 H_2O	200mg/l
$MnSO_4$ x 4 H_2O	50mg/l
dest. Wasser, pH 6.0 - 6.5	

Der Hefeextrakt wurde als zentrifugierte Lösung 3 000 x g zugesetzt.

Zur Herstellung fester Nährsubstrate wurden 2% Agar (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) zugesetzt.

Die Nährböden wurden bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Nährmedien, die D-Serin, D-Threonin, D-Leucin, D-Methionin und D-Valin enthielten, wurden dadurch hergestellt, indem konzentrierte D-Aminosäurelösungen getrennt autoklaviert wurden und dann steril zu den Medien in 2.2. gegeben wurden.

2.3. Kulturbedingungen und Anzucht

Die Lactobacillen wurden in MRS-Medium in hoher Schicht kultiviert. Alle übrigen Stämme wurden bei 30°C aerob unter Schuttein in Hefe-Dextrose-Bouillon gezogen.

Die lyophilisierten Ausgangskulturen oder die als Schrägagar-Kulturen vorliegenden Stämme wurden jeweils in 30 ml HD-Bouillon angeimpft und bei 30°C bebrütet.

Die gewachsenen Kulturen wurden im Phasenkontrastmikroskop auf Reinheit und morphologische Einheitlichkeit überprüft.

Die Lactobacillen wurden im Agar-Stich und alle übrigen Organismen auf Schrägagar bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Kulturen wurden alle 4 Wochen überimpft.

Zur Züchtung von Massenkulturen wurden je 2 ml der dichtbewachsenen Vorkultur in 300 ml HD-Bouillon (in 1 l Erlenmeyerkolben) überführt und unter Schütteln 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Ansätze von 2 - 3 l waren in der Regel ausreichend, um genügend Zellwandmaterial aus gehemmten Zellen zu erhalten. Für die Gewinnung von nukleotidaktivierten Mureinvorstufen wurden 8 - 10 l Kultur benötigt.

Zur Gewinnung von Mureinvorstufen wurde D-Serin in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase zugesetzt. Nach kurzfristiger Hemmung wurden die Zellen in der Verzögerungsphase geerntet. Durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm im Photometer der Firma Eppendorf konnte das Wachstum der Kulturen verfolgt werden.

2.4. Gewinnung der Zellwände

Die Gewinnung der Zellwände erfolgte nach der von Cummins et al. (1956) und Schleifer und Kandler (1967 a) beschriebenen Methode.

Nach mikroskopischer Überprüfung der Massenkulturen wurden diese zur Inaktivierung autolytischer Enzyme 20 Minuten im Dampftopf erhitzt und durch Zentrifugieren bei $3\ 200 \times g$ geerntet. Die Zellen wurden in einem Homogenisator der Firma Bühler, Tübingen, in einer Mischung mit ungefähr 2 Volumen Glasperlen von 0.17 - 0.18 mm ϕ der Firma Braun-Apparatebau, Melsungen, zerschlagen (für Lactobacillen wurden Glasperlen von 0.25 - 0.30 mm ϕ verwendet).

Im allgemeinen konnten nach 20 - 30 Minuten unter dem Phasenkontrastmikroskop keine ganzen Zellen mehr nachgewiesen werden. Die Zellfragmente wurden mit Hilfe einer Schott-G-1 Fritte von den Glasperlen getrennt und anschließend 20 Minuten bei 1 200 x g zentrifugiert. Dabei wird ein Sediment als "rohe Zellwände" erhalten.

Diese wurden in 0.05 M Phosphatpuffer (pH 7.8) zusammen mit Trypsin (Merck, 0.5 mg/ml) und 1 - 2 ml Toluol mit dem Ultraturrax-Homogenisator suspendiert und 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Die tryptisch gereinigten Zellwände (ZW-TRYP) wurden anschließend bei 12 000 x g abzentrifugiert, viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und im Lyophilisator getrocknet.

2.5. Reinigung der durch tryptische Verdauung gereinigten Zellwände mit Natriumdodecylsulfat (SDS)

Nach Shockman et al. (1964) wurden 150 mg tryptisch gereinigte Zellwände in 40 ml 4%iger Natriumdodecylsulfatlösung suspendiert. Unter Rühren wurden die Zellwände 8 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellwände dreimal gewaschen und dann gefriergetrocknet (ZW-SDS).

Dieser Reinigungsschritt war für die Zellwand von *Arthrobacter spec.* erforderlich, da diese nach der tryptischen Reinigung noch mureinfremde Aminosäuren enthielt. Die anfangs okkerfarbenen Zellwände wurden durch diesen Reinigungsschritt hellgrau und wiesen dann keine mureinfremden Aminosäuren mehr auf.

2.6. Hydrolysebedingungen

2.6.1. Totalhydrolyse

Die vollständige Hydrolyse des Mureins und der Peptide erfolgte nach Schleifer und Kandler (1967a) in der Regel mit 4N HCl

(0.1 ml/mg) im Einschlußrohr bei 100°C (Thermostat)
nach 16 Stunden (4n HCl/100°C/16h).

Zur Hydrolyse des schwerhydrolysierbaren Dipeptides δ -Amino-succinylornithin (Plapp und Kandler 1967 b) mußte bei *Lactobacillus cellobiosus* 6n Salzsäure und eine Hydrolysedauer von 16 Stunden bei 120°C verwendet werden. (6n HCl/120°C/16h)

2.6.2. Partialhydrolyse

Durch die Partialhydrolyse von Zellwänden mit 4n HCl (0.1ml/mg ZW) im Einschlußrohr bei 100°C wird das Murein in Peptide gespalten, mit Hilfe derer die Aufklärung der Aminosäuresequenz im Murein möglich ist. Die günstigen Hydrolysezeiten betragen für die einzelnen Peptide zwischen 30 - 45 Minuten. Für nukleotidaktivierte Mureinvorstufen war nur eine Hydrolysezeit von 5 - 10 Minuten erforderlich.

Nach beendeter Hydrolyse wurden die Röhrchen an der Spitze aufgebrochen und die Salzsäure mit Hilfe eines gereinigten Luftstroms unter gleichzeitigem Erwärmen der Probe im Wasserbad bei 40°C abgeblasen.

2.6.3. Alkalische Partialhydrolyse (Sheehan et al. 1968)

Peptidbindungen mit β -Hydroxy-Aminosäuren (Serin und Threonin) werden bei Raumtemperatur schnell von konzentrierten Mineralsäuren hydrolysiert (Desnuelle und Casal 1948, Hartmann 1964). Die leichte Spaltbarkeit erklärt das Fehlen von Dipeptiden mit C-terminalem Serin bzw. Threonin im sauren Partialhydrolysat. Zur Gewinnung dieser Peptide wurde eine alkalische Partialhydrolyse angewandt:

Die tryptisch gereinigten Zellwände wurden mit 4n Natronlauge (0.1 ml/mg ZW) 60 Minuten im Wasserbad bei 60°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Natronlauge mit dem Hy-

drolysat mit dem 10-fachen Volumen an destilliertem Wasser verdünnt und unter Eiskühlung vom Ungelösten abfiltriert. Die klare Lösung wurde unter weiterer Eiskühlung mit gewaschenem Dowex 50 Wx8 Mesh 100 - 200 (H^+) mit Hilfe eines pH-Meters salzfrei neutralisiert (pH 7.0).

Die Suspension wurde dann abfiltriert und das Ionenaustauscherharz solange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Filtrat nicht mehr mit Ninhydrin reagierte. Die Filtrate wurden anschließend im Rotationsverdampfer eingeeengt und papierchromatographisch getrennt.

Anmerkung:

Da Lysin und Lysinpeptide einen hohen isoelektrischen Punkt (pH 9.0) haben, konnten sie nicht aus dem Ionenaustauscherharz ausgewaschen werden (Biochemisches Taschenbuch 1964). Die Bestandteile des Glykanstranges, Muraminsäure und Glucosamin, fehlten im Hydrolysat, da glykosidische Bindungen durch Natronlauge nicht hydrolysiert werden.

2.7. Papier- und Dünnschichtchromatographie

2.7.1. Aminosäuren, Amino Zucker und Peptide

Zur Trennung von Aminosäuren, Amino zuckern und Peptiden wurde Chromatographiepapier Schleicher und Schüll 2043 b verwendet. Es wurde zweidimensional absteigend mit folgenden Laufmitteln chromatographiert:

I	Isopropanol/Wasser/Eisessig	= 75/10/15 (v/v)
II	a-Picolin/Wasser/Ammoniak	= 70/28/2 (v/v)

Als Nachweisreagenz diente ein Ninhydrin-Sprühmittel mit folgender Zusammensetzung:

Wassergesättigtes Butanol	930 ml
Eisessig	70 ml
Ninhydrin (Merck)	5 g

Entwickelt wurde im Thermostaten bei 100°C. Peptide mit N-terminalem Serin erschienen kurzzeitig braungelb. Erst dann schlug die Farbe nach blauviolett um.

Zur Identifizierung von Aminoazuckern, Aminosäuren und von bereits analysierten Peptiden genügte es, die R_{Ala} -Werte in den verschiedenen Laufmitteln zu bestimmen.

2.7.2. DNP-Aminosäuren

Die Trennung und Identifizierung von DNP-Aminosäuren in Totalhydrolysaten von dinitrophenylierten Zellwänden und von dinitrophenylierten Peptiden erfolgte durch Dünnschichtchromatographie. Dünnschichtplatten mit Kieselgel wurden mit Hilfe eines Streichgerätes der Firma Shandon in 0,25 mm Schichtdicke selbst hergestellt (Kieselgel nach Stahl, Merck). Die Platten wurden vor Gebrauch 1 Stunde bei 100°C aktiviert. Es wurde eindimensional aufsteigend in folgenden Lösungsmittelsystemen chromatographiert:

III Benzol/Eisessig	= 80/20	(v/v)
IV Chloroform/Methanol/Eisessig	= 95/5/1	(v/v/v)
V Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser	= 65/25/3/3	(v/v/v/v)

In Laufmittel III trennten sich gut DNP-Ala und di-DNP-Lys. Laufmittel IV wurde zur Trennung von DNP-Gly und di-DNP-Lys verwendet. In Laufmittel V gelang die Trennung von mono-DNP-Aminosäuren.

Als authentische Vergleichssubstanzen dienten DNP-Aminosäuren der Firma Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg.

Die DNP-Aminosäuren konnten durch ihre gelbe Eigenfarbe nachgewiesen werden. Die mono-DNP-Aminosäuren waren zusätzlich durch ihre positive Ninhydrinreaktion zu erkennen.

2.8. Präparative Chromatographie

2.8.1. Präparative Papierchromatographie zur Isolierung von Peptiden aus Zellwandhydrolysaten

Zur Isolierung größerer Mengen an Peptiden und zur Trennung kurz laufender Peptide wurde nach der Methode von Schleifer (1967a) und Kandler verfahren. Das für qualitative Zwecke zweidimensional durchgeführte papierchromatographische Trennverfahren wird hierbei durch wiederholte eindimensionale Trennverfahren in den Laufmitteln I und II ersetzt.

Bei leicht trennbaren Peptiden erfolgte die Isolierung aus zweidimensional entwickelten Chromatogrammen. Dazu wurden unter gleichen Bedingungen mehrere Chromatogramme mit je 5 mg hydrolysierten Zellwand angefertigt. Mit Ninhydrinreagenz wurde auf einem Chromatogramm die Aminosäure- und die Peptidverteilung festgestellt. Die Lage der Peptide wurde dann durch Pausen mit Kohlepapier auf die anderen Chromatogramme übertragen. Zur Kontrolle wurden von diesen Chromatogrammen bekannte Teile mit bereits bekannten Aminosäuren mit Ninhydrinreagenz besprüht. Die zu untersuchenden Peptidflecken wurden ausgeschnitten, mit destilliertem Wasser eluiert, hydrolysiert und mit Hilfe des Aminosäureanalysators untersucht.

2.8.2. Präparative Papierchromatographie zur Isolierung von nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Die N-Acetylglucosamin enthaltenden Fraktionen wurden nach der Sephadex-Gelfiltration eingeengt und in Streifen auf Chromatographiepapier Whatman 3MM aufgetragen. Die erste

Trennung erfolgte durch dreimal 16-stündiges Chromatographieren in folgendem Laufmittel:

VI Isobuttersäure/Wasser/ NH_4OH conc. = 250/145/5 (v/v/v)

Die Chromatographiebanden absorbierten im UV-Licht bei 260 nm. Als Vergleichssubstanz diente ATP. Die Chromatogramme mußten wegen der starken Absorption der Isobuttersäure drei Tage lang getrocknet werden. Durch Besprühen eines 1/2 cm breiten Randstreifens eines Chromatogramms mit Ninhydrinreagenz konnte die Lage von UDP-MurNac-Tri-, -Tetra- und -Pentapeptiden zusätzlich ermittelt werden. Die Banden wurden ausgeschnitten, mit destilliertem Wasser eluiert und in folgendem Laufmittel zweimal 12 Stunden lang rechromatographiert:

VII Äthylalkohol/ 1m-Ammoniumacetatlösung = 73/3 (v/v)

Als Vergleichssubstanz wurde UMP verwendet. Die im UV-Licht absorbierenden Banden wurden ausgeschnitten und mit Wasser eluiert.

2.8.3. Präparative Dünnschicht- und Papierchromatographie zur Isolierung von DNP-Aminosäuren

Die DNP-Aminosäuren wurden eindimensional absteigend auf Chromatographiepapier 2043 b getrennt. Es wurde entweder Laufmittel I oder folgendes Fließmittel verwendet:

VIII n-Propanol/0.2%ige wässrige Ammoniaklösung = 85/15 (v/v)

Mit Laufmittel I trennten sich ϵ -DNP-Lysin und DNP-Glycin gut, mit Laufmittel VIII DNP-Alanin und Dinitrophenol.

Für die quantitative Bestimmung von DNP-Aminosäuren wurden Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 0.4 mm verwendet. Die DNP-Aminosäuren wurden in den Laufmitteln III, IV

und V getrennt. Die durch ihre Eigenfarbe erkennbaren Flecken oder Banden wurden mit einem Spatel aus dem Chromatogramm geschabt und in Zentrifugengläschen überführt. Anschließend wurden die DNP-Aminosäuren mit folgendem Gemisch aus dem Kieselgel eluiert:

Äthylalkohol	100 ml
Wasser	100 ml
NH ₄ OH conc.	0.54 ml

2.9. Dinitrophenylierung

2.9.1. Dinitrophenylierung von Zellwänden (Takebe 1965)

20 mg Zellwand wurden in 5.0 ml destilliertem Wasser und 5 ml 2.5%-iger (w/v) Natriumhydrogencarbonatlösung mit Hilfe eines Sonifiers (Firma Braun, USA) bei Stufe 2 für 30 Sekunden aufgewirbelt. Dann wurden 20 ml einer frisch bereiteten 1.5%-igen (v/v) äthanolischen 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzollösung hinzugegeben und das Gemisch 14 Stunden im Dunkeln geschüttelt. Die dinitrophenylierten Zellwände wurden 20 Minuten bei 35 000 x g abzentrifugiert, nacheinander mit jeweils 30 ml Äther, 96%-igem Äthanol, 50%-igem Äthanol und mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich gefriergetrocknet.

2.9.2. Dinitrophenylierung von Peptiden (Ghuysen et al.1968)

Etwa 0.1 μ mol trockenes Peptid wurden in 100 μ l Puffer (Äthanol/Wasser/Triäthylamin = 8 : 1 : 1) aufgenommen, mit 15 μ l einer 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzollösung (130 μ l FDNB in 10 ml Äthanol) versetzt und 30 Minuten bei 60°C erhitzt. Lagen im Peptid zwei freie Aminogruppen vor, so wurde nochmals FDNB-Lösung hinzugegeben und erneut auf 60°C erhitzt. Die dinitrophenylierten Peptide wurden abgeblasen und dann hydrolysiert. Durch Ausschütteln mit Äther

wurden die mono-DNP-Aminosäuren und überschüssiges FDNB aus dem Hydrolysat extrahiert. Anschließend wurde das Hydrolysat mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt. Durch dreimaliges Ausschütteln mit wassergesättigtem Butanol konnten die mono-DNP-Aminosäuren extrahiert werden.

2.9.3. Dinitrophenylierung von freien Aminosäuren

Die Herstellung von mono-DNP-Diaminosäuren zu Vergleichszwecken erfolgte nach der Methode von Bailey (1962) und von Salton (1961).

80 mg Diaminosäuren wurden in 20 ml einer 2,5%-igen Natriumbicarbonatlösung gelöst. Diese Lösung wurde mit 40 ml Äthanol und 0.0725 ml 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol versetzt und 30 Minuten auf 60°C erhitzt. Anschließend wurde der Alkohol abdestilliert. Das überschüssige FDNB wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann mit ca. 2 ml 4n Salzsäure angesäuert. Die an beiden Aminogruppen dinitrophenylierten Diaminosäuren wurden durch Ausschütteln mit Äthylacetat entfernt. Die mono-DNP-Diaminosäuren konnten durch Ausschütteln mit Äthylacetat/Butanol = 1 : 1 extrahiert werden.

2.10. Quantitative Bestimmung des Gehaltes an dinitrophenylierbaren Aminosäuren

Die DNP-Aminosäuren des Totalhydrolysats von dinitrophenylierten Zellwänden wurden chromatographisch getrennt, eluiert und mit Hilfe von bekannten molaren Extinktionskoeffizienten (Salton 1961, Rao und Sober 1954, Takebe 1965) in dem beschriebenen Elutionsgemisch (Abschnitt 2.8.3.) bei einer Wellenlänge von 360 nm in einem Zeiss PMQ II-Photometer bestimmt.

Der Gehalt an dinitrophenylierbaren Aminosäuren in den DNP-Zellwänden wurde außerdem durch Vergleich des mit Hilfe des Aminosäureanalysators ermittelten Aminosäuregehalts in Hydrolysaten von tryptisch gereinigten und dinitrophenylierten Zellwänden bestimmt.

2.11. Quantitative Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren

2.11.1. Herstellung von wasserfreiem Hydrazin (Fraenkel-Conrat und Chun Ming Tsung 1967)

25 g 80%-iges Hydrazinhydrat (Merck) wurden unter Schütteln mit 250 ml Toluol und 250 g Calciumoxyd versetzt. Die Mischung wurde über Nacht stehen gelassen. Das Gemisch wurde dann unter Ausschluß von Feuchtigkeit 3 Stunden unter Rückflußkühlung gekocht. Das Azeotrop aus Hydrazin und Toluol (Siedepunkt $90 - 91^{\circ}\text{C}$) wurde anschließend destilliert. Aus der Vorlage kann das wasserfreie Hydrazin in getrocknete 10 ml-Schliffkolben überführt werden. Das wasserfreie Hydrazin wurde eingefroren und im Exsikator aufbewahrt.

2.11.2. Hydrazinolyse (Ghuysen et al. 1966)

5 mg der getrockneten Zellwand wurden in ein Pyrexzentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 2.5 ml eingewogen. Dieses wurde dann in ein größeres Reagenzglas gegeben, das am oberen Rand auf etwa $1/2$ cm verjüngt war. Die Proben wurden dann mit 0.5 ml wasserfreiem Hydrazin versetzt (für Peptide und Muropeptide reichten 0.3 ml). Durch Zuschmelzen an der vorgefertigten Verjüngung wurden die Röhrchen vor Feuchtigkeit geschützt.

Das Reaktionsgemisch wurde 48 Stunden lang bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Aufbrechen der Röhrchen wurde das überschüssige Hydrazin im Vakuum über konz. Schwefelsäure abdestilliert.

Die trockenen Proben wurden in 0.5 ml einer wässrigen Norleucinlösung (0.1 μ mol/ml als innerer Standard) aufgenommen und mit 0.1 ml Benzaldehyd versetzt. Zur Entfernung der Hydrazide wurden die Röhrchen alle 5 Minuten mit einem Whirlmix durchgeschüttelt und nach einer Stunde 5 Minuten lang bei 1 200 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgehoben, nochmals mit Benzaldehyd versetzt und auf dieselbe Weise behandelt.

Zur Entfernung des Benzaldehyds wurde der Überstand dreimal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und mit Hilfe eines gereinigten Luftstroms zur Trockene eingedampft. Der Aminosäuregehalt wurde mit Hilfe des Aminosäureanalysators bestimmt und mit dem Hydrazinolysegrad des Standards korrigiert.

Als Hydrazinolysestandard für Zellwände dienten trichloroessigsäureextrahierte Zellwände von *M. lysodeikticus*. Als Standard für die Hydrazinolyse von Peptiden und von Muropeptiden wurden Ala-Gly und Gly-Ala verwendet.

Der Hydrazinolysegrad betrug in den Zellwänden von *M. lysodeikticus* 65 - 70% und in den Peptiden 70 - 85%.

2.12. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren, Aminoazuckern und Ammoniak

Aminosäuren, Aminoazucker und Ammoniak wurden quantitativ mit Hilfe eines vollautomatischen Aminosäureanalysators der Firma Beckmann bestimmt.

2.13. Quantitative Bestimmung von Methionin (Needleman 1970)

20 mg tryptisch gereinigte Zellwand wurden in 1.0 ml 99%-iger Ameisensäure (Merck) suspendiert und unter Rühren mit 1.0 ml Methanol versetzt. Zu dieser Mischung wurden

dann 10 ml Perameisensäure hinzugefügt. Perameisensäure und Zellwandsuspension wurden vor dem Zusammengeben auf -7°C - -10°C gekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 1/2 Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Die Herstellung von Perameisensäure erfolgte durch Mischen von 9.5 ml 99%-iger Ameisensäure und 0.5 ml Perhydrol (Merck). Diese Mischung wurde 2 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abbruch der Reaktion wurde die Lösung mit 50 ml Eiswasser verdünnt und eingefroren. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung entfernt.

Durch Perameisensäure wurde das in die Zellwand eingebaute D-Methionin quantitativ zu Methioninsulfon oxidiert. Die Bestimmung des Methioninsulfons erfolgte mit Hilfe des Aminosäureanalysators. Als Vergleichssubstanz diente authentisches Methioninsulfon (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg).

2.14. Bestimmung der Konfiguration von Aminosäuren (Larson et al. 1970)

5 mg total hydrolysierte Zellwände wurden nach dem Einengen zur Trockene in 0.5 ml L-Valinlösung (0.5 μmol L-Valin pro 0.5 ml als innerer Standard) aufgenommen und in zwei Hälften zu 0.2 ml geteilt. Ein Teil wurde als Kontrolle mit Hilfe des Aminosäureanalysators untersucht. Der zweite Teil wurde eingeeengt und mit folgenden Lösungen behandelt:

- 0.5 ml Lösung A (5 mg FAD, Boehringer und Söhne, Mannheim
0.05 ml 50%-ige Streptomycinsulfatlösung,
Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg,
10ml 0.1 m Natriumpyrophosphatpuffer, pH
8.3
- 1 ml Lösung B (0.02 m Natriumpyrophosphatpuffer, pH 8.3

0.5 ml Lösung C (5 mg D-Aminosäureoxidase, Boehringer
und Söhne, Mannheim
5 ml 0.02 m Natriumpyrophosphatpuffer
pH 8.3

Das Reaktionsgemisch wurde 6 Stunden bei 37°C inkubiert und während dieser Zeit mit Sauerstoff durchperlt. Zur Ausfällung des Proteins wurde die Mischung 5 Minuten gekocht und dann 5 Minuten bei 12 000 x g abzentrifugiert. Aus dem klaren Überstand wurde der Aminosäuregehalt bestimmt.

D-Alanin und D-Serin wurden durch diese Behandlung vollständig zerstört.

Durch Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von unbehandelten und mit D-Aminosäureoxidase behandelten Proben konnte der Gehalt an D- und L-Alanin berechnet werden.

2.15. Bestimmung des N-Acetylglucosamingehaltes

Die Bestimmung der N-Acetylaminosucker erfolgte mit Hilfe des Morgan-Elson-Reagens nach der von Reissig et al. (1955) entwickelten Methode.

Je 0.5 ml der Mureinvorstufen enthaltenden Fraktionen wurden zur Abspaltung des UDP mit 0.005 ml 1n Salzsäure versetzt und 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben mit 1n KOH neutralisiert.

Die Proben wurden dann mit 0.1 ml 0.1m Boratpuffer pH 9.2 versetzt und 3 Minuten in ein kochendes Wasserbad gebracht. Nach dem Abkühlen wurden den Proben 3 ml Reagens (10.5 g Dimethylaminobenzaldehyd in 87.5 ml Eisessig und 12.5 ml konz. Salzsäure, 1 : 10 mit Eisessig vor Gebrauch verdünnt) zugesetzt und 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Der rote Farbkomplex wurde sofort gegen eine Blindprobe, die die gleiche Menge Wasser enthielt, gemessen. Die gefundenen Werte wurden auf eine mit N-Acetylglucosamin angelegte Eichkurve (0 - 0.1 μ mol/0.5 ml) bezogen.

2.16. Untersuchung der Empfindlichkeit der Organismen gegenüber D-Aminosäuren

Es wurde eine Konzentrationsreihe von je 30 ml Medium mit 0.1 ml Vorkultur beimpft und bebrütet. Das Wachstum der Kulturen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt.

2.17. Isolierung von nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Die Gewinnung der Mureinvorstufen erfolgte entweder aus dem Kochextrakt oder durch TES-Extraktion nach Chatterjee und Perkins (1966).

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 50 - 100 ml Wasser suspendiert und 15 Minuten gekocht. Aus dem Überstand der abzentrifugierten Suspension wurden durch Sephadex-Gelfiltration (2.18.) die Mureinvorstufen isoliert.

Bei der TES-Extraktion wurden die geernteten Zellen in einem vierfachen Volumen kalter 25%-iger TES suspendiert. Die Suspension wurde 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen und dann 10 Minuten bei 20 000 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit dem Sediment wiederholt. Die beiden TES-Extrakte wurden gereinigt, fünfmal mit Äther ausgeschüttelt, mit Ammoniak neutralisiert und am Rotationsverdampfer auf wenige ml eingeengt.

Der eingeengte Extrakt wurde mit dem gleichen Volumen Äthanol versetzt. Der dadurch ausgefallene Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 32 000 x g entfernt. Der klare Überstand wurde anschließend am Rotationsverdamp-

pfer auf 2 - 3 ml eingeengt und durch Sephadex-Gelfiltration fraktioniert.

2.18. Sephadex-Gelfiltration (Rosenthal und Sharon 1964)

Der eingeengte Zellextrakt (2 - 3 ml) wurde auf eine Sephadexsäule (Sephadex G 25 fine, 80 x 2.5 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Wasser mit einer Geschwindigkeit von 4 - 6 Tropen pro Minute. Fraktionen mit 99 Tropfen (= 5 ml) wurden gesammelt und auf ihre Absorption bei 260 nm untersucht (automatische UV-Messung, LKB, Stockholm). Die UV absorbierenden Fraktionen wurden auf ihren N-Acetylglucosamingehalt untersucht, vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt und papierchromatographisch getrennt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von *Corynebacterium callunae*

Der Einbau von Glycin in das Murein unter dem Einfluß von Glycinkonzentrationen, die gerade noch ein Wachstum zulassen, wurde von Hammes (1972) an mehreren Organismen nachgewiesen. Wir versuchten deshalb, die noch nicht geklärte Frage, ob auch D-Serin in der Lage ist, das D-Alanin im Murein zu ersetzen, zuerst bei *Corynebacterium callunae* zu klären.

Das Murein von *C. callunae* gehört dem m-Dpm-direkt-Typ an. Charakteristisch für diesen Typ ist erstens meso-Dpm als Diaminosäure und zweitens die direkte Quervernetzung der Peptiduntereinheiten. Das L-Zentrum liegt dabei stets in der Peptiduntereinheit, während die Aminogruppe des D-Zentrums mit dem C-terminalen D-Alanin der Peptiduntereinheit vernetzt ist. Bei *C. allunae* sind außerdem die α -Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure und die Carboxylgruppe des D-Zentrums von meso-Dpm amidiert. Dieser Mureintyp ist bei allen untersuchten gramnegativen Bakterien, Blaualgen, verschiedenen Familien von grampositiven Bakterien und Actinomyceten realisiert. Vier Organismen dieses Mureintyps wurden untersucht.

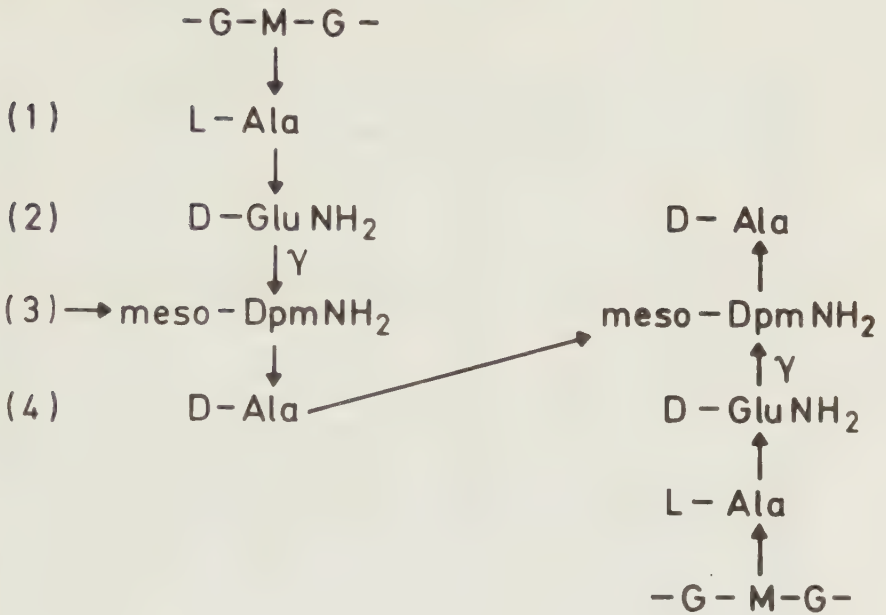


Abb. 1 Primärstruktur eines Mureinfragments von *C. cal-lunae* (meso-m-Dpm-direkt-Typ)

Im Vorversuch wurde die Empfindlichkeit gegenüber D-Serin bestimmt. Bei einem Zusatz von 0.3% D-Serin zum Medium war das Wachstum zu 30% gehemmt. Bei einer Konzentration von 1% D-Serin waren die Zellen vollständig lysiert. Die Verminderung im Wachstum war von morphologischen Veränderungen begleitet. Die normalerweise coryneformen Organismen waren stark verbreitert, bauchig und aufgeschwollen.

3.1.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Aminosäureanalyse, Hydrazinolyse, Dinitrophenylierung und Konfigurationsbestimmung des Alanins von Zellwänden von D-Serin gehemmten (0.3%) Zellen zusammengefaßt.

Ein Vergleich mit der Kontrollzellwand (Hammes 1972) zeigt, daß der Gehalt an Alanin um 0.34 Mol abnimmt und daß dafür 0.46 Mol D-Serin pro Mol Muropeptid eingebaut werden.

Die Quervernetzungsrate kann bei diesem Organismus erstens durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren ermittelt werden. Dazu wurden Zellwände dinitrophenyliert und hydrolysiert. Aus der Differenz des Aminosäuregehaltes zwischen unbehandelter und dinitrophenylierter Zellwand ergaben sich 0.54 Mol N-terminale Dpm pro Mol Muropeptid. Hieraus errechnet sich eine Quervernetzungsrate von 46%.

Die dünnschichtchromatographische Trennung der dinitrophenylierten Zellwand ergab nur mono-DNP-Dpm, die photometrisch bestimmt werden konnte. Auf diese Weise wurden 0.45 Mol pro Mol Muropeptid gefunden, was einer Quervernetzungsrate von 55% entspricht.

Die Quervernetzung kann zweitens durch die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren ermittelt werden. Die Hydrazinolyse ergab 0.1 Mol Alanin und 0.29 Mol D-Serin als C-terminale Aminosäuren.

Tab. 2 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäuren und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von C. callunae und B. subtilis (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen

Species	Molare Verhältnisse										C-terminal			N-terminal	Quervernetzungsrate in %	Hemmung der Quervernetz. gegenüber d. Kontrolle in %
	Mur	GlcNH ₂	Glu	m-Dpm	L-Ala	D-Ala	D-Ser	m-Dpm ⁺			Ala	D-Ser	m-Dpm ⁺⁺			
<i>C. callunae</i>	a	1.10	0.80	1.0	0.90	1.00	0.79	-	0.16	0.20	-	0.36	64	22		
	b	0.88	0.83	1.0	0.98	0.98	0.47	0.46	0.11	0.10	0.29	0.50	50			
<i>B. subtilis</i>	a	0.49	1.10	1.0	1.01	1.00	0.59	-	0.52	0.03	-	0.55	45	33		
	b	0.88	0.90	1.0	1.08	1.00	0.32	0.32	0.46	0.02	0.22	0.70	30			

+ Differenz zwischen den N-terminalen und den C-terminalen Aminosäuren

++ Mittelwert aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen der Aminosäuren im ZW-TRYP und DNP-ZW und der photometrischen Bestimmung der DNP-Aminosäuren

Zieht man von der Summe an Alanin und D-Serin (1.91 Mol pro Mol Muropeptid) 1 Mol L-Alanin ab, das sich in Position 1 der Peptiduntereinheit befinden muß, so verbleiben 0.91 Mol D-Aminosäuren in Position 4. Von diesen 0.91 Mol Aminosäuren sind 0.39 Mol C-terminal. Es verbleiben somit 0.52 Mol Aminosäuren in Position 4 als nicht C-terminal. Dies entspricht einer Quervernetzungsrate von 52%.

Aus den N-terminalen Aminosäuren, die durch Photometrie und Differenzbildung bestimmt wurden, ergibt sich ein durchschnittlicher Quervernetzungsgrad von 50%.

Demgegenüber sind die normal gezogenen Zellen zu 64% vernetzt (Hammes 1972).

Die unter dem Einfluß von D-Serin gewachsenen Zellen sind also um etwa $1/5$ (22%) schlechter vernetzt.

Geht man davon aus, daß keine Pentapeptide vorliegen, so ergibt sich beim Vergleich der C-terminalen Aminosäuren (0.39 Mol) und den freien Aminogruppen eine Differenz von 0.11 Mol pro Mol Muropeptid. Neben den Tetrapeptiden mit C-terminalem D-Alanin und D-Serin liegt dieser Anteil vermutlich als Tripeptid mit C-terminaler Dpm vor. Da die Dpm amidiert ist, kann dieser Wert nicht direkt bestimmt werden.

Auch das Ergebnis der Konfigurationsbestimmung des Alanins kann zur Lokalisierung des D-Serins in der Peptiduntereinheit herangezogen werden. Es wurden 0.98 Mol L-Alanin und 0.47 Mol D-Alanin gefunden. Daraus geht hervor, daß sich praktisch kein D-Serin in Position 1 der Peptiduntereinheit befinden kann. Das gesamte eingebaute D-Serin muß sich daher in Position 4 der Peptiduntereinheit befinden, wo es C-terminal gefunden wird und wie D-Alanin an der Quervernetzung beteiligt ist.

Letzteres wird dadurch bewiesen, daß sich nur $2/3$ des eingebauten D-Serins als C-terminal erweisen. Der Rest (0.17 Mol) muß daher an der Quervernetzung beteiligt sein.

Einen direkten Aufschluß über die Lokalisierung des D-Serins in der Peptiduntereinheit liefert die Analyse des Partialhydrolysates. Beim Vergleich der sauren Partialhydrolysate von normalen und seringehemmten Zellwänden konnte neben Serin ein zusätzlicher Fleck (Abb. 2) gefunden werden, der sich nach dem Besprühen mit Ninhydrin anfangs gelb färbte und erst dann in das bekannte Blauviolett überging.

Er enthielt Dpm und Serin im Verhältnis 1 : 1. Bei der Dinitrophenylierung wurde DNP-Ser und mono-DNP-Dmp gefunden. Es handelt sich also um das Peptid D-Ser-Dpm aus der Quervernetzung. Das Peptid Dpm-D-Ser konnte im sauren Partialhydrolysat nicht nachgewiesen werden, da alle Peptidbindungen, bei denen β -Hydroxyaminosäuren als C-Terminus (Serin oder Threonin) beteiligt sind unter dem Einfluß starker Säuren schnell hydrolysiert werden. Zum Erfolg führte die alkalische Partialhydrolyse mit 4n NaOH. (Sheehan 1968, Hladny 1971)

Unter den Bedingungen der alkalischen Partialhydrolyse konnte das Peptid Dpm-D-Ser schließlich isoliert werden. (Abb. 2) Das Hydrolysat des dinitrophenylierten Peptids ergab di-DNP-Dpm.

Aus der Zellwandanalyse geht hervor, daß D-Serin in Position 4 der Peptiduntereinheit enthalten ist. Daher war anzunehmen, daß auch die nukleotidaktivierten Mureinvorstufen D-Serin in den Positionen 4 und 5 enthalten. Um dies zu zeigen, wurden die unter D-Serineinfluß gebildeten Vorstufen isoliert.

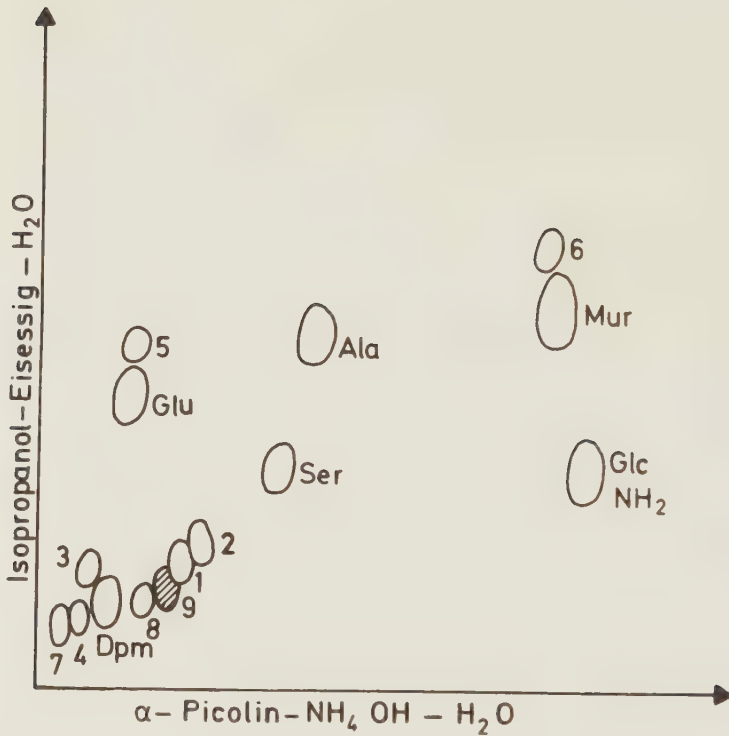


Abb. 2 Schema eines zweidimensionalen Papierchromatogramms eines Partialhydrolysates (4n HCl/100°C/40 Min.) der Zellwand von *C. callunae* (mit 0.3% D-Serin gehemmt)

1= D-Ala-Dpm, 2= Dpm-D-Ala, 3= D-Glu-Dpm-D-Ala, 4= L-Ala-D-Glu-Dpm, 5= L-Ala-D-Glu, 6= Mur-L-Ala, 7= Tetrapeptide, 8= D-Ser-Dpm

Peptid 9 aus alkalischer Partialhydrolyse (4n NaOH/60°C/30 Min.) hinzugefügt, 9= Dpm-D-Ser

3.1.2. Untersuchung der unter D-Serineinfluß angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Im Vorversuch wurde zunächst untersucht, ob unter dem Einfluß hemmender Serinkonzentrationen überhaupt N-Acetylaminozucker angereichert werden. Aus der Abb. 3 ist ersichtlich, daß unter dem Einfluß steigender Serinkonzentrationen (0.1, 0.2, 0.3% D-Serin) eine vermehrte Anreicherung von N-Acetylaminozuckern erfolgte. Die Anreicherung von N-Acetylaminozuckern gegenüber der Kontrolle war bei 0.3% D-Serin etwa 2 1/2 fach.

Die nukleotidaktivierten Vorstufen wurden deswegen aus Zellen gewonnen, die mit 0.3% D-Serin gehemmt waren.

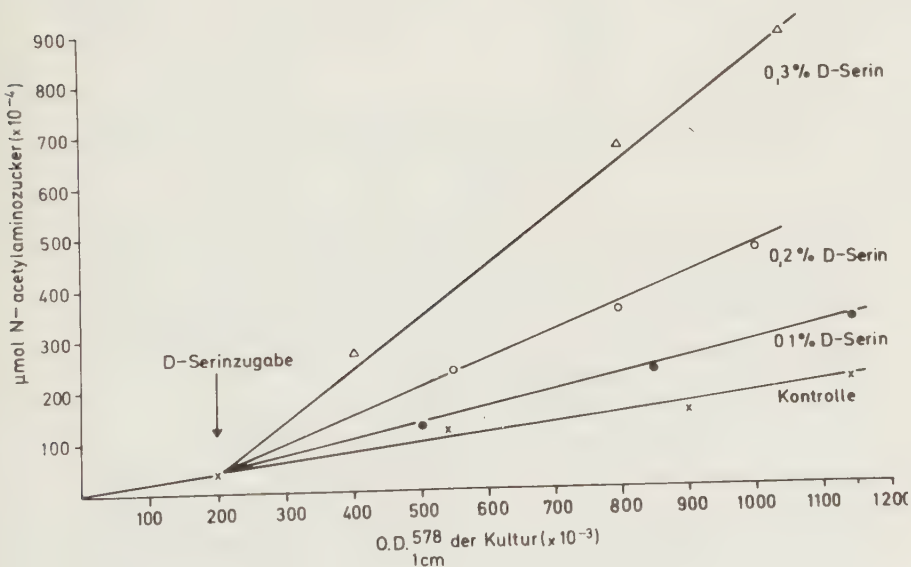


Abb. 3 Anreicherung von N-Acetylaminozuckern unter dem Einfluß von D-Serin

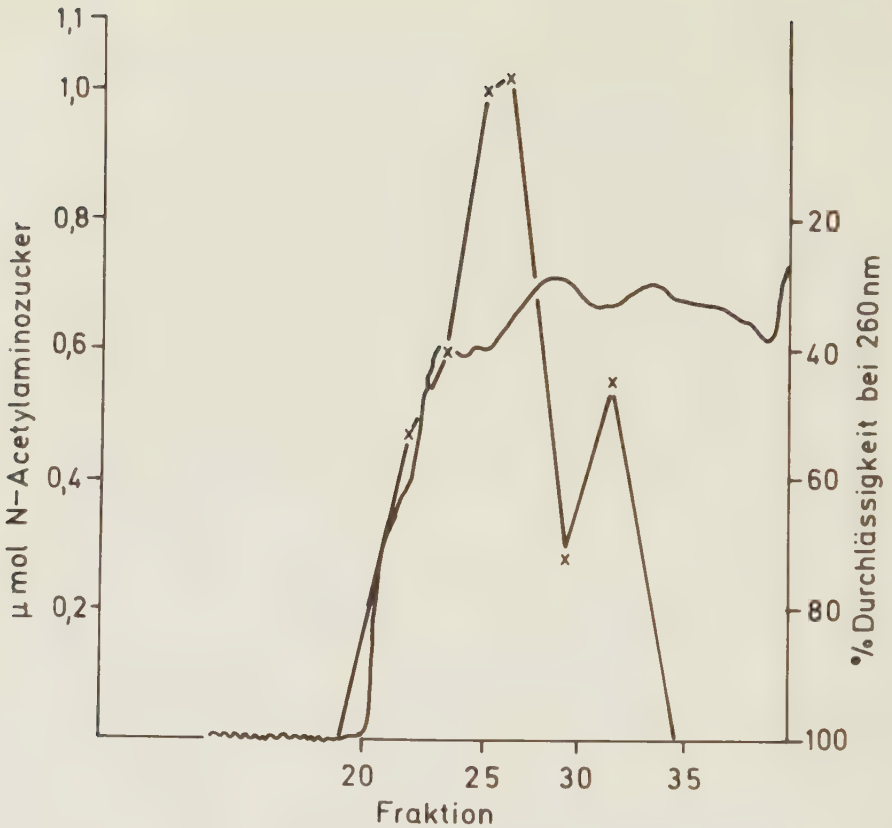


Abb. 4 Auftrennung des TES-Extraktes aus seringehemmten Zellen von *C. Callunae* durch Sephadex-Gelfiltration (durchgehende Linie = Durchlässigkeit bei 260 nm, Kreuze = N-Acetylaminozucker).

Der Zellextrakt wurde aus 8 l Kultur gewonnen und anschließend durch Sephadex-Gelfiltration getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Absorption bei 260 nm und auf ihren Gehalt an N-Acetylaminozuckern untersucht. (Abb. 4)

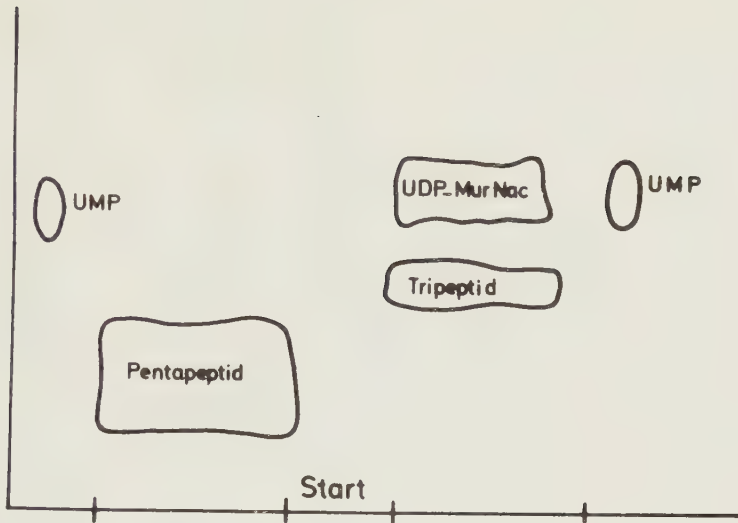


Abb. 5 Schema eines Chromatogramms der Mureinvorstufenfraktionen (Laufmittel VII)

Die Fraktionen 20 - 27 und 28 - 33 wurden vereinigt und in Laufmittel VI chromatographiert. Die im UV-Licht absorbierenden Banden wurden eluiert und in Laufmittel VII rechromatographiert. Das Schema eines solchen Chromatogramms zeigt die Abb. 5

Bei der Rechromatographie in Laufmittel VII fielen folgende Fraktionen an (Berechnungsbasis Muraminsäure):

UDP-MurNac	0.85 / μ mol
UDP-MurNac-Tripeptid	0.35 / μ mol
UDP-MurNac-Pentapeptid	1.97 / μ mol

Das Tri- und das Pentapeptid wurde näher untersucht. In Tab. 3 sind die Werte der Aminosäurezusammensetzung zusammengestellt.

Tab. 3 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminozucker und der C-terminalen Aminosäuren in den einzelnen Vorstufenfraktionen aus seringehemmten (0.3%) Zellen von C. callu-
nae (Glu = 1)

Fraktion	μmol	Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	m-Dpm	D-Ser	L-Ala	D-Ala	C-terminal D-Ser Ala	Vorstufe
I	0.85	+	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-MurNac
II	0.35	1.10	-	1.05	1.0	0.90	-	1.05	-	-	UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-m-Dpm
III	1.97	1.20	-	1.60	1.0	0.92	1.39	0.98	0.59	0.67 0.33	UDP-MurNac-Pentapeptidge- misch

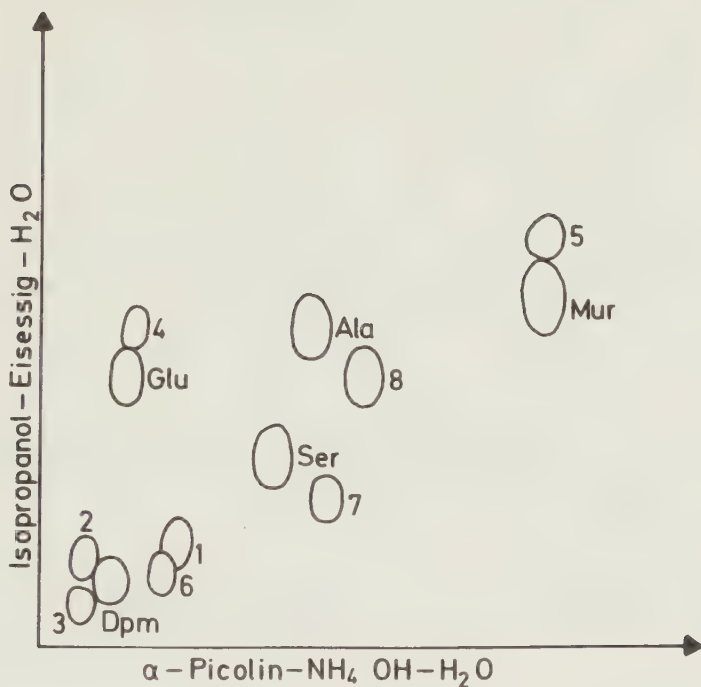


Abb. 6 Schema eines sauren Partialhydrolysates (4n HCl/ 100°C/5 Min.) des aus seringehemmten Zellen von *C. callu-nae* isolierten UDP-MurNac-Pentapeptides

1= Dpm-D-Ala, 2= D-Glu-Dpm-D-Ala, 3= L-Ala-D-Glu-Dpm,
4= L-Ala-D-Glu, 5= Mur-L-Ala, 6= Dpm-D-Ser, 7= D-Ser-
D-Ser, 8= D-Ser-D-Ala

In ein Mol des UDP-MurNac-Pentapeptides wurden 1.39 Mol D-Serin eingebaut. Davon war etwa die Hälfte (0.67 Mol) C-terminal. Von den 1.60 Mol Alanin konnten 0.33 Mol C-terminal und 1 Mol als L-Alanin in Position 1 nachgewiesen werden.

Über die Lokalisation des übrigen D-Serins innerhalb des Pentapeptides sollte die Partialhydrolyse Auskunft geben. Im Chromatogramm eines Partialhydrolysates (Abb. 6) konnten die serinhaltigen Peptide D-Ser-D-Ser und D-Ser-D-Ala gefunden werden. Aus dem Auftreten des Dipeptids D-Ser-D-Ser läßt sich folgern, daß ein Teil des Vorstufenpentapeptids an Stelle des normalerweise vorkommenden D-Ala-D-Ala das Peptid D-Ser-D-Ser aufweist. Da das Verhältnis der C-terminalen Aminosäuren 67 : 33 beträgt, dürfte es sich bei den isolierten Vorstufen um ein Gemisch zweier UDP-MurNac-Pentapeptide mit folgender Primärstruktur handeln. (Abb. 7)

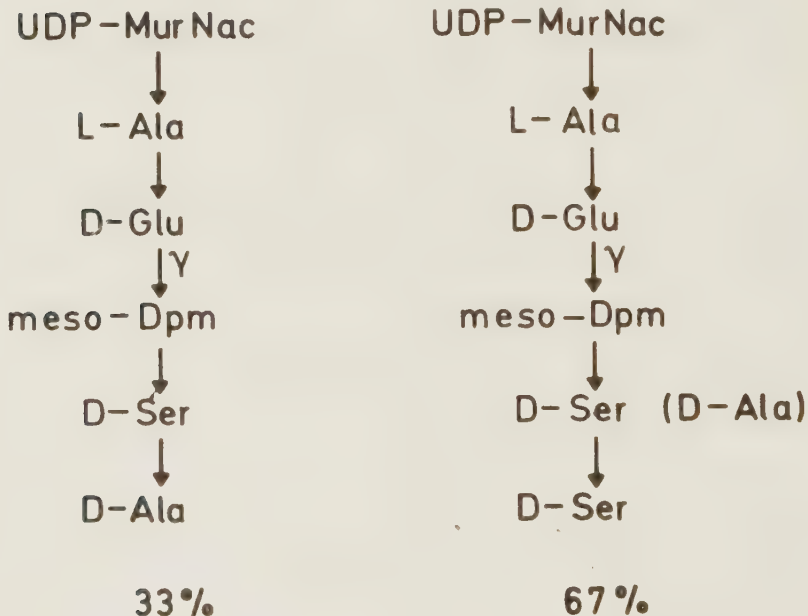


Abb. 7 Primärstruktur der aus seringehemmten Zellen von *C. callunae* isolierten UDP-MurNac-Pentapeptide

3.2. Die Wirkung von weiteren D-Aminosäuren auf das Murein von *Corynebacterium callunae*

Um zu klären, ob die Befunde für D-Serin auch für andere D-Aminosäuren gelten, wurde der Einfluß von D-Threonin, D-Leucin, D-Valin und D-Methionin auf das Murein von *C. callunae* untersucht.

Im Vorversuch wurde zunächst die Wirksamkeit dieser D-Aminosäuren auf das Wachstum von *C. callunae* bestimmt. Dabei erwies sich der Organismus gegenüber diesen D-Aminosäuren wesentlich unempfindlicher als gegenüber D-Serin.

Durch 2,5% D-Threonin erfolgte nach 24 Stunden eine Wachstumsverminderung um 80%. Die Empfindlichkeit gegenüber D-Valin, D-Leucin und D-Methionin war nahezu gleich. Mit 2,5% dieser D-Aminosäuren war das Wachstum zu 60% gehemmt. Bei dieser hohen Konzentration war die Form der Zellen stark verändert. Ebenso wie unter dem Einfluß von D-Serin waren die Zellen unförmig und aufgeschwollen.

3.2.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen

Für die Untersuchung des Mureins wurden zunächst Zellen verwendet, die mit niedrigeren Konzentrationen gehemmt waren. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Aminosäureanalysen von Zellwänden aus gehemmten Zellen zusammengestellt. Bei den mit 0,3% D-Threonin gehemmten Zellen erfolgte ein Einbau von 0,16 Mol D-Thr in das Murein. Der Alaningehalt nimmt mit 1,76 Mol gegenüber 1,79 Mol in der Kontrollzellwand nur geringfügig ab.

Tab. 4 Molare Verhältnisse der Aminosäuren und der Aminozucker in den Zellwänden von *C. callunae* beim Zusatz verschiedener D-Aminosäuren zum Medium (Glu = 1)

D-Aminosäure	Hemmkonzentration in %	Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	m-Dpm	D-Ser	D-Thr	D-Val	D-Leu	D-Met	Ala und D-aminosäure
D-Ser	0.3	0.88	0.82	1.45	1.0	0.98	0.46	-	-	-	-	1.91
D-Thr	0.3	1.10	0.81	1.76	1.0	1.04	-	0.16	-	-	-	1.93
D-Val	0.5	1.15	0.84	1.73	1.0	0.97	-	-	0.19	-	-	1.92
D-Leu	0.5	1.20	0.82	1.84	1.0	1.03	-	-	-	0.20	-	2.04
D-Met	0.5	1.12	0.85	1.67	1.0	0.94	-	-	-	-	+	1.67

+ Ein Einbau von D-Methionin war aus der Zellwandanalyse nicht zu erkennen.

Auch nach der Oxidation des Methionins zum Methioninsulfon mit Perameisensäure war ein Einbau nicht nachzuweisen.

In die valingehemmten Zellen (0.5%) wurden nur 0.19 Mol D-Valin pro Mol Muropeptid in das Murein eingebaut. Diese geringe Menge bewirkt keine nennenswerte Abnahme im Alaningehalt (1.73 Mol gegenüber 1.79 Mol Alanin in der Kontrolle).

Unter D-Leucineinfluß (0.5%) erfolgte ein Einbau von 0.2 Mol in das Murein. Der Alaningehalt liegt mit 1.84 Mol geringfügig über dem der Kontrollzellwand (1.79 Mol).

Ein Einbau von D-Methionin in das Murein war bei dieser Konzentration (0.5%) aus der Zellwandanalyse nicht zu erkennen. Auch nach der Oxidation der Zellwand mit Perameisensäure (Methionin zu Methioninsulfon) war ein Einbau nicht nachzuweisen. Der Alaningehalt liegt mit 1.67 Mol um 0.12 Mol unter dem der Kontrolle.

Da die eingebauten Mengen an D-Aminosäure unter 0.2 Mol pro Mol Muropeptid lagen, wurde der Versuch unternommen, mit höheren Konzentrationen (2.5%) einen erhöhten Einbau von D-Valin, D-Leucin, D-Threonin und D-Methionin in das Murein zu erhalten.

3.2.2. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen (2.5% D-Threonin)

Die Untersuchung des Mureins wurde wie bei den seringehemmten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Zellwandanalyse sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Unter dem Einfluß von D-Threonin wurden 0.39 Mol D-Threonin pro Mol Muropeptid in das Murein eingebaut. Ein Vergleich mit der Kontrollzellwand zeigt, daß der Alaningehalt um 0.36 Mol abnimmt. Diese Abnahme wird fast vollständig durch den Einbau von D-Threonin ausgeglichen.

Tab 5 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosucker und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von *C. callunae* (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen (2.5% D-Thr) c) gehemmte Zellen (2.5% D-Leu)

Molare Verhältnisse										C-terminal		N-terminal	Quervernetzungsrate in %	Hemmung d. Quervernetzungsrate gegenüber d. Kontr. in %
	Mur	GlcNH ₂	Glu	m-Dpm	L-Ala	D-Ala	D-Thr	D-Leu	m-Dpm ⁺	Ala	D-Thr	D-Leu		
a	1.10	0.80	1.0	0.90	1.0	0.79	-	-	0.16	0.20	-	-	0.36	-
b	0.81	0.83	1.0	1.02	1.0	0.43	0.39	-	0.16	0.08	0.31	-	0.55	30
c	0.89	0.91	1.0	1.03	1.0	0.70	-	0.37	0.25	0.17	-	0.16	0.58	34

+ Differenz zwischen den N-terminalen und C-terminalen Aminosäuren

++ Mittelwert aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen der Aminosäuren in ZW-TRYP und DNP-ZW und der photometrischen Bestimmung der DNP-Aminosäuren

Die Quervernetzung kann wiederum auf verschiedene Weisen ermittelt werden. Durch Differenzbildung wurden 0,58 Mol und durch photometrische Bestimmung 0,51 Mol Dpm pro Mol Muropeptid N-terminal gefunden. Hieraus berechnen sich Quervernetzungsraten von 42 bzw. 49%.

Mit Hilfe der Hydrazinolyse wurden 0,31 Mol D-Threonin und 0,08 Mol Alanin C-terminal gefunden. Als nicht C-terminal verbleiben 0,43 Mol D-Aminosäure in Position 4, was einer Quervernetzung von 43% entspricht. Aus den N-terminalen Aminosäuren, die durch Differenzbildung und Photometrie gefunden wurden, ergibt sich eine durchschnittliche Quervernetzungsrates von 45%. Die Zellwand ist also gegenüber der Kontrolle (64%) um etwa $1/3$ (30%) schlechter vernetzt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Gesamtmenge des D-Threonins in Position 4 der Peptiduntereinheit eingebaut wird. Von den 0,39 Mol können $3/4$ C-terminal nachgewiesen werden. Das übrige D-Threonin muß an der Quervernetzung beteiligt sein. Es zeigt sich, daß durch den Einfluß von D-Threonin qualitativ dieselben Veränderungen wie durch D-Serin hervorgerufen werden.

3.2.3. Die Wirkung von D-Leucin auf das Murein von *C. callunae*

Die Zellen wurden in Gegenwart von 2,5% D-Leucin gezogen. Die Ergebnisse der Untersuchungen des Mureins zeigt die Tab. 5. In das Murein wurden 0,37 Mol D-Leucin pro Mol Muropeptid eingebaut. Der Alaningehalt nimmt mit 1,70 Mol gegenüber 1,79 Mol in der Kontrollzellwand nur geringfügig ab. Die Summe aus Alanin und D-Leucin liegt über 2 Mol pro Mol Muropeptid.

Durch Differenzbildung wurden 0.61 Mol und durch Photometrie 0.55 Mol Dpm an N-terminalen Aminosäuren gefunden. Daraus ergaben sich Quervernetzungsrate von 39 bzw. 45%. Aus diesen Bestimmungsmöglichkeiten errechnet sich eine Quervernetzungsrate von 42%.

Gegenüber der Kontrolle ist die Zellwand aus leucingehehmten Zellen um etwa $1/3$ (34%) schlechter vernetzt.

Mit Hilfe der Hydrazinolyse wurden 0.17 Mol Alanin und 0.16 Mol D-Leucin C-terminal gefunden. Da sich gegenüber den freien Aminogruppen eine Differenz von 0.25 Mol ergibt, kann das Ergebnis der Hydrazinolyse für die Berechnung der Quervernetzung nicht herangezogen werden. Man kann annehmen, daß in diesem Ausmaß Tripeptide vorliegen. Da die Dpm als Amid vorliegt, kann dieser Wert nicht direkt bestimmt werden.

Gegen das alleinige Auftreten von Tripeptiden spricht die Tatsache, daß die Summe der D-Aminosäuren nicht unter 1, sondern über 1 Mol pro Mol Muropeptid liegt. Dieser Widerspruch läßt sich klären, wenn man annimmt, daß neben Tripeptiden auch Pentapeptide vorliegen.

Das Vorliegen von Pentapeptiden wird durch die Partialhydrolyse bewiesen. Im Vergleich zu normalen Zellwänden konnten in den Chromatogrammen der leucinhaltigen Zellwände zusätzlich zwei Flecken gefunden werden (Abb. 8).

Peptid 10 enthielt Dpm und Leucin im Verhältnis 1 : 1. Das Hydrolysat des dinitrophenylierten Peptides ergab di-DNP-Dpm. Es handelt sich somit um das Peptid Dpm-D-Leu.

Durch Co-Chromatographie konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem Fleck 11 (Abb. 8) um das Peptid D-Leu-D-Ala handelt.

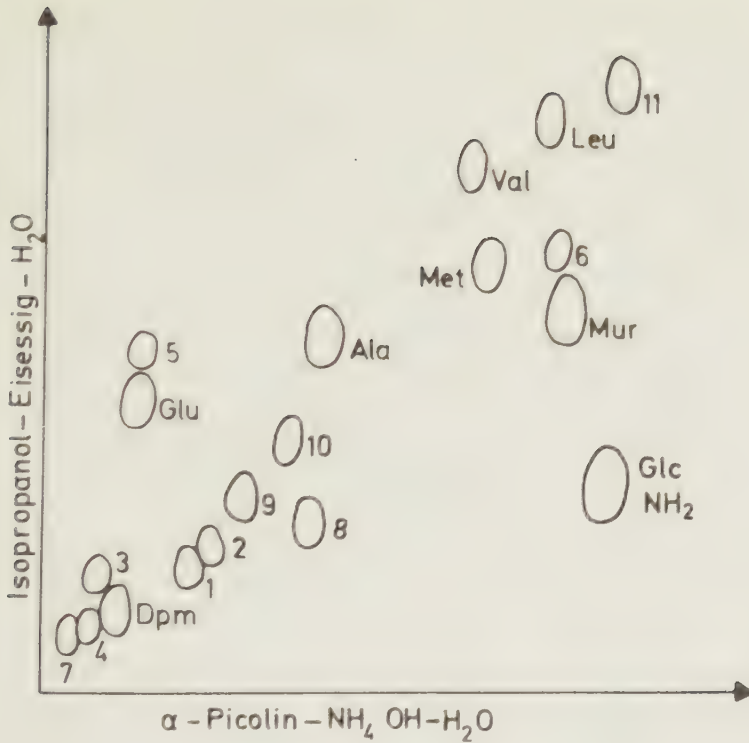


Abb. 3 Schema eines zweidimensionalen Papierchromatogramms eines Partialhydrolysates (4n HCl/100°C/40 Min.) der Zellwand von *C. callunae*

(mit 2.5% D-Leu, 2.5% D-Val, oder 2.5% D-Met gehemmt)

1= D-Ala-Dpm, 2= Dpm-D-Ala, 3= D-Glu-Dpm-D-Ala, 4= L-Ala-D-Glu-Dpm, 5= L-Ala-D-Glu, 6= Mur-L-Ala, 7= Tetrapeptide
8= Dpm-D-Met, 9= Dpm-D-Val, 10= Dpm-D-Leu

11 = D-Leu-D-Ala

Durch die Ergebnisse der Partialhydrolyse und der Hydrazinolyse ist gesichert, daß dieser Organismus D-Leucin in die Position 4 der Peptiduntereinheit einbaut. Das Auftreten des Peptids D-Leu-D-Ala liefert einen Beweis dafür, daß ein Teil der Peptiduntereinheiten als Penta-peptid vorliegt. Aus diesem Grund ist der Anteil an C-terminalem D-Leucin stark verringert.

Aus der Differenz der C-terminalen Aminosäuren gegenüber den freien Aminogruppen ergibt sich, daß 0.25 Mol pro Mol Muropeptid als Tripeptid vorliegen. Aus den Ergebnissen der Hydrazinolyse und der Partialhydrolyse läßt sich folgern, daß 0.16 Mol als Tetrapeptid mit C-terminalem D-Alanin vorliegen. Wie die Dinitrophenylierung zeigt, sind 0.42 Mol an der Quervernetzung mit der benachbarten Peptiduntereinheit beteiligt.

3.2.4. Der Einfluß von D-Valin auf das Murein von *C. callunae*

Die Zellwände wurden aus Zellen gewonnen, die mit 2.5% D-Valin gehemmt waren. Wie die Tab. 6 zeigt, wurden in das Murein 0.29 Mol D-Valin pro Mol Muropeptid eingebaut. Der Gehalt an Alanin geht mit 1.71 Mol gegenüber 1.79 Mol in der Kontrolle nur geringfügig zurück.

An N-terminalen Aminosäuren wurden 0.63 Mol durch Differenzbildung und 0.56 Mol Dpm durch Photometrie gefunden. Daraus ergeben sich Quervernetzungs-raten von 37 bzw. 44%.

Aus diesen Bestimmungsmöglichkeiten errechnet sich als Durchschnittswert eine Quervernetzungsrate von 41%. Gegenüber der 64%-igen Quervernetzung der Kontrollzellwand ist die Zellwand aus valingehemmten Zellen um etwa $1/3$ (36%) schlechter vernetzt.

Tab. 6 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäuren und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von *C. callunae* (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen (2.5% D-Val) c) gehemmte Zellen (2.5% D-Met)

Molare Verhältnisse										C-terminal			N-terminal	Quer- ver- netzungs- rate in %	Hemmung d. Quer- ver- netzungs- rate in %
Mur	GlcNH ₂	Glu	m-Dpm	L-Ala	D-Ala	D-Val	D-Met	m-Dpm ⁺	Ala	D-Val	D-Met	m-Dpm ⁺⁺			
a	1.10	0.80	1.0	0.90	1.0	0.79	-	0.16	0.20	-	-	0.36	64	-	
b	1.17	0.85	1.0	1.01	1.0	0.71	0.29	0.23	0.22	0.14	-	0.59	41	36	43
c	1.13	0.80	1.0	1.01	1.0	0.71	0.31	0.28	0.19	-	0.16	0.63	37	42	

+ Differenz zwischen den N-terminalen und den C-terminalen Aminosäuren

++ Mittelwert aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen der Aminosäuren in ZW-TRYP und DNP-ZW und der photometrischen Bestimmung der DNP-Aminosäuren

Durch die Hydrazinolyse wurden 0.22 Mol Alanin und etwa die Hälfte des eingebauten D-Valins (0.14 Mol) C-terminal gefunden. Gegenüber den freien Aminogruppen ergibt sich eine Differenz von 0.23 Mol pro Mol Muropeptid. Vermutlich liegt dieser Anteil wiederum als Tripeptid vor.

Aus dem Chromatogramm eines sauren Partialhydrolysates konnte das Peptid Dpm-D-Val (Abb. 8) isoliert werden. Hieraus läßt sich schließen, daß D-Valin ebenfalls in die Position 4 der Peptiduntereinheit eingebaut wird.

Aus dem geringen Anteil an C-terminalem D-Valin, dem Auftreten des Peptids Dpm-D-Val, dem hohen Anteil an D-Aminosäuren pro Mol Muropeptid (0.95 Mol) und dem erhöhten Anteil an C-terminalem Alanin muß gefolgert werden, daß wie bei den leucingehemmten Zellen ein Teil des Mureins als Pentapeptid mit D-Valin in Position 4 und D-Alanin in Position 5 vorliegt.

3.2.5. Der Einfluß von D-Methionin auf das Murein von *C. callunae*

Die Zellwände wurden aus Zellen gewonnen, die in Gegenwart von 2.5% D-Methionin gezogen waren. Die Ergebnisse der Zellwandanalyse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Unter dem Einfluß von D-Methionin wurden 0.31 Mol pro Mol Muropeptid in das Murein eingebaut. D-Methionin wurde nach der Oxidation mit Perameisensäure als Methioninsulfon bestimmt. Der Alaningehalt liegt mit 1.71 Mol um 0.08 unter dem der Kontrolle.

Durch Differenzbildung wurden 0.66 Mol und durch photometrische Bestimmung 0.60 Mol Dpm an N-terminaler Amino-

säure gefunden. Daraus ergeben sich Quervernetzungsraten von 34 bzw. 40%.

Aus diesen Bestimmungsmöglichkeiten errechnet sich eine durchschnittliche Quervernetzungsrate von 37%.

Das bedeutet gegenüber der 64%-igen Quervernetzung der Kontrollzellwand eine Verschlechterung um $2/5$ (42%).

Mit Hilfe der Hydrazinolyse wurden 0.19 Mol Alanin und die Hälfte des eingebauten D-Methionins (0.16 Mol) C-terminal gefunden. Aus der Differenz der C-terminalen Aminosäuren zu den freien Aminogruppen ergibt sich, daß 0.31 Mol pro Mol Muropeptid als Tripeptid vorliegen.

Im Chromatogramm eines sauren Partialhydrolysates konnte das Peptid Dpm-D-Met (Abb. 8) gefunden werden. Das Auftreten dieses Peptids beweist den Einbau von D-Methionin in Position 4 der Peptiduntereinheit.

Da diese Zellwandanalyse weitgehend mit den Zellwandanalysen aus leucin- und valingehemmten Zellen übereinstimmt, muß angenommen werden, daß auch hier ein Teil der Peptiduntereinheiten als Pentapeptid mit D-Methionin in Position 4 und D-Alanin in Position 5 vorliegt.

Es zeigt sich, daß durch D-Leucin, D-Valin und D-Methionin qualitativ dieselben Veränderungen hervorgerufen werden. Diese Veränderungen bestehen in der Herabsetzung der Quervernetzung von 64% in der Kontrollzellwand auf etwa 40% in den gehemmten Zellen und dem Einbau der "falschen" Aminosäure in Position 4 der Peptiduntereinheit.

Mit Hilfe der Hydrazinolyse kann die eingebaute D-Aminosäure etwa zur Hälfte C-terminal gefunden werden. Im Vergleich zu den Zellwänden, die unter dem Einfluß von D-Serin bzw. D-Threonin isoliert wurden, ist der Anteil an

C-terminalem Alanin erhöht. Durch das Auftreten des Peptids D-Leu-D-Ala (Abb. 8) ist gesichert, daß ein Teil der Peptiduntereinheiten als Pentapeptid mit "falscher" D-Aminosäure in Position 4 und mit C-terminalem D-Alanin in Position 5 vorliegt.

3.3. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von *Bacillus subtilis*

Die Zellwand von *B. subtilis* wurde bereits eingehend untersucht. (Warth und Strominger 1967, Young 1965, Hughes et al. 1970).

Sie enthält Ribititeichonsäure und das Murein gehört dem m-Dpm-direkt-Typ an. Die Dpm in der Peptiduntereinheit ist amidiert, die Glutaminsäure dagegen nicht.

Gegenüber D-Serin ist *B. subtilis* wesentlich empfindlicher als *C. callunae*. Bereits 0.2% D-Serin führten zu einer 40%-igen Wachstumshemmung, mit 0.5% D-Serin war das Wachstum vollständig gehemmt. Unter dem Einfluß dieser Konzentrationen traten morphologische Veränderungen auf. Die Zellen waren deutlich verlängert und in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt.

Die Zellwände und die nukleotidaktivierten Mureinvorstufen wurden aus Zellen gewonnen, die mit 0.2% D-Serin gehemmt waren.

3.3.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen

Die Ergebnisse der Zellwandanalyse sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Ein Vergleich der Zellwände der unbehandelten Kontrolle (Hammes 1972) mit den Zellwänden von gehemmten Zellen zeigt, daß 0.32 Mol D-Serin in das Murein eingebaut wurden.

Der Alaningehalt geht von 1.59 auf 1.32 Mol zurück. Diese Abnahme im Gehalt an Alanin wird durch den Einbau von D-Serin ausgeglichen.

Durch Differenzbildung zwischen dem Aminosäuregehalt der unbehandelten und der dinitrophenylierten Zellwand wurden 0.73 Mol Dpm N-terminal gefunden, was einer Quervernetzungsrate von 27% entspricht.

Die chromatographische Bestimmung der hydrolysierten DNP-Zellwand ergab nur mono-DNP-Dpm. Durch Photometrie wurden 0.67 Mol Dpm N-terminal gefunden, woraus sich eine 33%-ige Quervernetzung errechnet.

Mit Hilfe der Hydrazinolyse ergaben sich 0.02 Mol Alanin und 0.22 Mol D-Serin als C-terminal. Als nicht C-terminal verbleiben 0.40 Mol D-Aminosäure in Position 4 der Peptiduntereinheit, was einer Quervernetzung von 40% entspricht.

Aus den durch Differenzbildung und Photometrie bestimmten N-terminalen Aminosäuren ergibt sich für die Quervernetzung ein durchschnittlicher Wert von 30%.

In der Kontrollzellwand ist die Quervernetzung zu 45% verwirklicht (Hammes 1972). Die Zellwände, die aus seringehemmten Zellen gewonnen wurden, sind also um $1/3$ (33%) schlechter vernetzt.

Die Verteilung des eingebauten D-Serins in der Peptiduntereinheit ist ähnlich wie bei *C. callunae*. Der Einbau von D-Serin erfolgt in Position 4 der Peptiduntereinheit, wo es zu $2/3$ bei der Hydrazinolyse C-terminal erscheint.

3.3.2. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Die nukleotidaktivierten Vorstufen wurden nach Hemmung mit 0.2% D-Serin mit TES aus den Zellen extrahiert, durch Sephadex-Gelfiltration fraktioniert und durch Papierchromatographie in den Laufmitteln VI und VII aufgetrennt. Dabei fielen folgende Fraktionen an (Berechnungsbasis Muraminsäure):

UDP-MurNac	0.2 / μ mol
UDP-MurNac-Tripeptid	0.35 / μ mol
UDP-MurNac-Pentapeptid	2.50 / μ mol

Das Tri- und das Pentapeptid wurden näher untersucht. Die Zusammensetzung der beiden Peptide ist in Tab. 7 zusammengestellt.

In 1 Mol des Pentapeptides wurden 1.31 Mol D-Serin eingebaut. Das eingebaute D-Serin ist zu 63% C-terminal. Im Chromatogramm eines sauren Partialhydrolysates konnten die serinhaltigen Peptide D-Ser-D-Ser und D-Ser-D-Ala gefunden werden (s. Abb. 6)

Die Mureinvorstufe von *B. subtilis* gleicht in den molaren Verhältnissen derjenigen, die aus *C. callunae* isoliert werden konnte. Der Anteil an C-terminalem D-Serin ist jedoch erhöht.

Tab. 7 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Amino Zucker und der C-terminalen Aminosäuren in den einzelnen Vorstufenfraktionen aus seringeheumten (0.2%) Zellen von B. subtilis (Glu = 1)

Fraktion	μmol	Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	m-Dpm	D-Ser	L-Ala	D-Ala	C-terminal D-Ser Ala	Vorstufe
I	0.20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-MurNac
II	0.35	1.20	-	0.90	1.0	0.85	-	0.90	-	-	UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-m-Dpm
III	2.50	1.10	-	1.51	1.0	0.95	1.31	1.00	0.50	0.82 0.18	UDP-MurNac-Pentapeptidgemisch

3.3.3. Der Einfluß von D-Threonin, D-Valin und D-Leucin auf das Murein von *B. subtilis*

Im Vorversuch wurde zunächst die Empfindlichkeit dieser D-Aminosäuren auf das Wachstum von *B. subtilis* untersucht. Mit 0.3% D-Threonin war das Wachstum zu 40% gehemmt, mit 0.5% D-Leucin bzw. D-Valin trat eine 50%-ige Wachstums-
hemmung ein. Unter dem Einfluß dieser Konzentrationen an D-Aminosäuren traten auch morphologische Veränderungen ein. Sie entsprachen denen, wie sie auch unter dem Einfluß von D-Serin beobachtet werden konnten. Die Zellen waren in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt und verlängert.

In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Aminosäureanalysen und der Dinitrophenylierung von Zellwänden aus gehemmten Zellen zusammengestellt.

Unter dem Einfluß von 0.3% D-Threonin wurden 0.11 Mol pro Mol Muropeptid eingebaut. Der Alaningehalt geht von 1.59 in der Kontrolle auf 1.41 Mol zurück.

In die valingehemmten Zellen wurden 0.18 Mol D-Valin eingebaut. Der Alaningehalt geht auf 1.47 Mol zurück.

Unter dem Einfluß von 0.5% D-Leucin erfolgte ein Einbau von 0.15 Mol D-Leucin. Der Alaningehalt geht wiederum auf 1.47 Mol zurück.

Auch diese geringen Mengen an eingebauter "falscher" D-Aminosäure bewirken eine Veränderung in der Quervernetzungsrate. Die N-terminale Dpm wurde aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen der Dpm in den unbehandelten und den dinitrophenylierten Zellwänden berechnet.

Wie die Ergebnisse der Tab. 8 zeigen, geht der Quervernetzungsgrad von 45% in der Kontrollzellwand auf 36% in den Zellwänden aus threoningehemmten Zellen zurück. In den Zellwänden aus leucin- und valingehemmten Zellen beträgt die Quervernetzungsrate 37 bzw. 34%.

Tab. 8 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäuren und der N-terminalen Aminosäuren von
B. subtilis beim Zusatz verschiedener D-Aminosäuren (Glu = 1)

D-Aminosäure	Konzentration an D-Aminosäure in %	Molare Verhältnisse										N-terminal	Quervernetzungsrate in %	Hemmung der Quervernetzungsrate gegenüber der Kontr.i. %
		Mur	GlcNH ₂	Glu	m-Dpm	L-Ala	D-Ala	D-Thr	D-Leu	D-Val				
-	-	0.89	1.10	1.0	1.01	1.0	0.59	-	-	-	0.55	45	-	
D-Thr	0.3	0.86	1.02	1.0	1.02	1.0	0.41	0.11	-	-	0.64	36	20	
D-Leu	0.5	0.85	0.95	1.0	1.01	1.0	0.47	-	0.15	-	0.63	37	18	
D-Val	0.5	0.97	1.11	1.0	1.04	1.0	0.47	-	-	0.18	0.66	34	24	

+ berechnet aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen der Aminosäuren in ZW-TRYP und DNP-ZW

3.4. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von *Arthrobacter spec.*

Das Murein von *Arthrobacter spec.* gehört ebenfalls dem meso-Dpm-direkt-Typ an. Mit 0.4% D-Serin war das Wachstum zu 60% gehemmt. Die Morphologie war stark verändert. Die sonst stäbchenförmigen Organismen waren verbreitert und an den Zellenden aufgeblasen. Für die Untersuchung des Mureins wurden Zellen verwendet, die mit 0.4% D-Serin gehemmt waren.

Ein Vergleich der Zellwände von gehemmten Zellen (Tab. 9) mit der Kontrolle (Hammes 1972) zeigt, daß der Alanin-gehalt um 0.36 Mol abnimmt und daß diese Abnahme durch den Einbau von 0.35 Mol D-Serin ausgeglichen wird.

Die Quervernetzungsrate wurde wieder in verschiedener Weise ermittelt. Durch Differenzbildung wurden 0.46 Mol und durch Photometrie 0.51 Mol Dpm an N-terminaler Aminosäure gefunden. Daraus ergeben sich Quervernetzungs-raten von 54 bzw. 49%.

Durch die Hydrazinolyse wurden 0.26 Mol D-Serin und 0.09 Mol D-Alanin C-terminal gefunden. Es verbleiben 0.45 Mol D-Aminosäure in Position 4, die eine 45%-ige Quervernet-zung anzeigen.

Aus den N-terminalen Aminosäuren, die durch Differenzbil-dung und durch Photometrie ermittelt wurden, errechnet sich eine mittlere Quervernetzungsrate von 52%.

Gegenüber der Kontrolle, die zu 75% vernetzt ist (Ham-mes 1972) ist diese Zellwand um etwa $1/3$ (31%) schlech-ter vernetzt.

Tab. 9 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminozucker und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von A. spec. und L. plantarum (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen

Species	Molare Verhältnisse								C-terminal		N-terminal	Quervernetzungsrate in %	Hemmung der Quervernetz. gegenüber d. Kontr. in %
	Mur	GlcNH ₂	Glu	m-Dpm	L-Ala	D-Ala	D-Ser	m-Dpm ⁺	Ala	D-Ser			
A.spec.	a	0.97	1.08	1.0	0.96	1.0	0.81	-	0.15	0.10	0.25	75	31
	b	1.07	1.16	1.0	0.98	1.0	0.45	0.35	0.13	0.09	0.26	52	
L.plant.	a	0.90	1.37	1.0	0.97	1.0	0.51	-	0.46	0.03	-	51	35
	b	0.93	1.06	1.0	1.06	1.0	0.42	0.28	0.38	0.07	0.22	33	

+ Differenz zwischen den N-terminalen und den C-terminalen Aminosäuren

++ Mittelwert aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen der Aminosäuren in ZW-TRYP und DNP-ZW und der photometrischen Bestimmung der DNP-Aminosäuren

Es zeigt sich, daß bei diesem Organismus unter dem Einfluß von D-Serin ähnliche Veränderungen wie bei *C. cal lunae* auftreten. Aus diesem Grunde wurde auf die Isolierung der Vorstufen verzichtet.

3.5. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von *L. plantarum*

Die Zellwand von *L. plantarum* wurde bereits eingehend untersucht (Weiss et al. 1967, Matsuda et al. 1968). Sie entspricht in den molaren Verhältnissen der Aminosäuren, in der Quervernetzung und im Gehalt an Ribititeichonsäure weitgehend der Zellwand von *B. subtilis*. Zusätzlich ist lediglich die Amidierung der Glutaminsäure.

Mit 0.5% D-Serin war das Wachstum zu 40% gehemmt. Die Zellen waren unter dem Einfluß dieser Konzentrationen z. T. verlängert, stark verkrümmt und an den Zellenden aufgeschwollen.

Die Isolierung der Zellwände und der nukleotidaktivierten Mureinvorstufen erfolgte aus Zellen, die mit 0.5% D-Serin gehemmt waren.

In das Murein der gehemmten Zellen wurden 0.28 Mol D-Serin pro Mol Muropeptid eingebaut (Tab. 9). Der Gehalt an Alanin geht von 1.51 Mol in der Kontrollzellwand (Hammes 1972) auf 1.42 Mol in den seringehemmten Zellen zurück.

Durch Differenzbildung zwischen der unbehandelten und der dinitrophenylierten Zellwand wurden 0.65 Mol Dpm N-terminal gefunden. Dies entspricht einer Quervernetzung von 35%. Die photometrische Bestimmung der N-terminalen Dpm ergab 0.69 Mol pro Mol Muropeptid. Hieraus errechnet sich eine Quervernetzungsrate von 31%.

Mit Hilfe der Hydrazinolyse wurden 0.22 Mol D-Serin und 0.07 Mol D-Alanin C-terminal gefunden. Von den 0.70 Mol D-Aminosäuren in Position 4 sind somit 0.41 Mol an der Quervernetzung beteiligt, was einer Quervernetzungsrate von 41% entspricht.

Aus den durch Differenzbildung und durch Photometrie ermittelten N-terminalen Aminosäuren errechnet sich eine durchschnittliche Quervernetzungsrate von 33%.

Die Kontrollzellwand ist zu 51% vernetzt (Hammes 1972). Die Zellwände aus seringehemmten Zellen sind also um etwa $1/3$ (35%) schlechter vernetzt.

3.5.1. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Die Mureinvorstufen wurden bei *L. plantarum* aus dem Kochextrakt der Zellen gewonnen, aus denen auch die Zellwände isoliert wurden. Dieser Kochextrakt wurde durch Sephadex-Gelfiltration und Papierchromatographie in den Laufmitteln VI und VII fraktioniert. Aus 8 l Kultur konnten folgende Vorstufen isoliert werden (Berechnungsbasis Muraminsäure):

UDP-MurNac	3.70 / μ mol
UDP-GlcNac	0.67 / μ mol
UDP-MurNac-L-Ala	0.31 / μ mol
UDP-MurNac-Tetrapeptid	11.80 / μ mol

Die Zusammensetzung der einzelnen Vorstufenfraktionen ist in der Tab. 10 zusammengestellt.

In das UDP-MurNac-Tetrapeptid wurden 0.74 Mol D-Serin eingebaut. Das eingebaute D-Serin konnte durch die Hydrazinolyse fast vollständig C-terminal gefunden werden.

Tab. 10 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäure und der C-terminalen Aminosäuren in den einzelnen Vorstufenfraktionen aus seringehemmten Zellen (0.5%) von L. plantarum (Glu = 1)

Fraktion	μmol Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	m-Dpm	D-Ser	L-Ala	D-Ala	C-terminal D-Ser Ala	Vorstufe
I	3.20	+	-	-	-	-	-	-	-	UDP-MurNac
II	0.62	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-GlcNac
III	0.31	0.95	-	1.00	-	-	1.0	-	-	UDP-MurNac-L-Ala
IV	11.80	1.18	-	1.27	1.0	1.08	1.0	0.30	0.70 0.25	UDP-MurNac-Tetrapeptidgemisch

Das Auftreten dieser kurzen Mureinvorstufe kann mit dem bis heute bekannten Mechanismus der Mureinbiosynthese nicht in Einklang gebracht werden.

Die gefundenen Ergebnisse stimmen jedoch mit denen von Hammes (1972) überein. Aus den glycingehemmten Zellen von *L.cellobiosus* und *L. plantarum* konnte ebenfalls ein Tetrapeptid isoliert werden, in dem das D-Alanin in Position 4 teilweise durch Glycin ersetzt ist. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Tetrapeptiden wäre das Vorkommen einer Carboxypeptidase I, die das C-terminale D-Alanin bzw. D-Serin abspaltet. Dieses Enzym wurde von Izaki und Strominger (1968) aus *E.coli* isoliert und hat eine bevorzugte Affinität zu nukleotid-aktivierten Mureinvorstufen, greift aber unvernetztes Murein kaum an.

3.6. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von *Lactobacillus cellobiosus*

Das Murein von *L. cellobiosus* gehört dem L-Orn-D-Asp-Typ an. Dieser Typ ist gekennzeichnet durch Ornithin als Diaminosäure und der Quervernetzung zwischen der δ -Aminogruppe des Ornithins und dem D-Alanin einer benachbarten Peptiduntereinheit über D-Asparagin als Interpeptidbrücke.

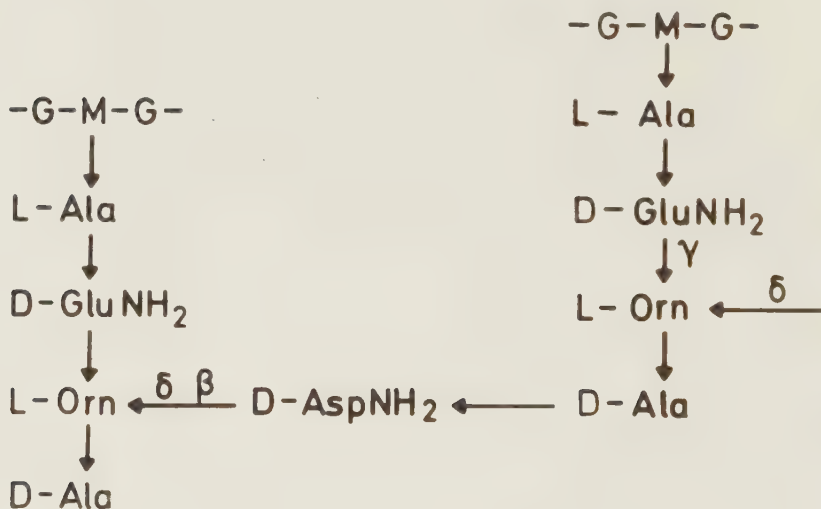


Abb. 9 Schema der Primärstruktur eines Mureinfragments von *L. cellobiosus* nach Plapp und Kandler (1967 a)

Bei einem Zusatz von 0,3% D-Serin zum Medium war das Wachstum zu 35% gehemmt. Unter dem Einfluß von D-Serin traten gleichzeitig morphologische Veränderungen auf. Die Zellen waren 3 - 5 mal so lang wie die der Kontrolle und stark verkrümmt. An den Zellpolen wiesen sie

außerdem Verdickungen auf. Die Zellwände und die nukleotidaktivierten Mureinvorstufen wurden aus Zellen gewonnen, die unter dem Einfluß von 0.3% D-Serin gezogen waren.

3.6.1. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen

Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse, Dinitrophenylierung, Hydrazinolyse und der Konfigurationsbestimmung des Alanins sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Vergleicht man die Zellwände von ungehemmten Zellen (Hammes 1972) mit denen von seringehemmten, so findet man, daß die Abnahme im Alaningehalt (von 1.61 Mol auf 1.29 Mol) durch den Einbau von 0.27 Mol D-Serin ausgeglichen wird. Ornithin wird zu einem geringen Anteil durch Lysin ersetzt. Ferner ist eine Abnahme im Asparaginsäuregehalt festzustellen.

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren wurden Zellwände dinitrophenyliert und hydrolysiert. Bei der Dünnschichtchromatographie wurden DNP-Asp und DNP-Orn gefunden. Da auch ein unbekannter Fleck auftrat - vermutlich δ -DNP-Aminosuccinylornithin - konnte die Berechnung der freien Aminogruppen nur durch Differenzbildung zwischen unbehandelten und dinitrophenylierten Zellwänden erfolgen. Durch Differenzbildung wurden 0.42 Mol DNP-Orn, 0.28 Mol DNP-Asp und 0.02 Mol DNP-Lys pro Mol Muropeptid gefunden. Die Summe an N-terminalen Aminosäuren beträgt 0.72 Mol pro Mol Muropeptid. Das entspricht einer Quervernetzungsrate von 28%. Der Gehalt an C-terminalen Aminosäuren wurde durch Hydrazinolyse bestimmt. Das eingebaute D-Serin war zu $3/4$ C-terminal.

Aus dem Anteil an nicht C-terminaler D-Aminosäure in

Tab. 11 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäuren und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von *L. cellobiosus* (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen (0.3% D-Ser)

Molare Verhältnisse														C-terminal				N-terminal +				Quervernetzungsrate in %	Hemmung d. Quervernetzungsrate gegenüber d. Kontr. in %
	Mur	GlcNH ₂	Glu	Orn	Lys	Asp	L-Ala	D-Ala	D-Ser	Ala	Orn	Lys	D-Ser	Orn	Lys	Asp							
a	1.03	1.13	1.0	0.96	-	0.89	1.0	0.61	-	0.06	0.37	-	-	0.06	-	0.37	57	51					
b	1.20	1.16	1.0	0.94	0.08	0.72	1.0	0.29	0.27	0.05	0.36	0.04	0.21	0.42	0.02	0.28	28						

+ berechnet aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen der Aminosäuren in den Zellwänden in ZW-TRYP und DNP-ZW

Position 4 errechnet sich eine Quervernetzungsrate von 30%. ($D\text{-Ala} + D\text{-Ser} = 0.56$, - 0.21 Mol C-terminales $D\text{-Ser} + 0.05$ Mol C-terminales $D\text{-Ala} = 0.30$ Mol = 30%). Aus den N-terminalen Aminosäuren, die durch Differenzbildung ermittelt wurden, ergibt sich in der Kontrollzelle eine Quervernetzungsrate von 57%. Demgegenüber ist die Zellwand aus seringehemmten Zellen zu 28% vernetzt. Das bedeutet eine Verschlechterung im Quervernetzungsgrad um etwa die Hälfte (51%).

3.6.2. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Im Vorversuch wurde gefunden, daß unter dem Einfluß von 0,3% D-Serin eine vierfache Anreicherung von N-Acetylaminozuckern erfolgt.

Der aus 8 l Kultur gewonnene Zellextrakt wurde nach dem üblichen Verfahren fraktioniert. Dabei fielen folgende Fraktionen an (Berechnungsbasis Muraminsäure):

UDP-MurNac	4.5 / μ mol
UDP-GlcNac	2.0 / μ mol
UDP-MurNac-Tetrapeptid I	14.0 / μ mol
UDP-MurNac-Tetrapeptid II	2.8 / μ mol

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Vorstufenfraktionen zeigt die Tab. 12.

Die Analysen zeigen, daß sich keine nennenswerten Unterschiede im Aminosäuregehalt der beiden Tetrapeptide ergeben. Beide Fraktionen wurden hydrazinolysiert. In beiden Fällen konnte nur D-Serin als C-terminale Aminosäure gefunden werden. Das gesamte Alanin besitzt L-Konfiguration.

Bei den isolierten UDP-MurNac-Tetrapeptiden handelt es sich wieder um verkürzte Mureinvorstufen, in denen das D-Alanin in Position 4 der Peptiduntereinheit vollständig durch D-Serin ersetzt ist.

Tab. 12 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäuren und der C-terminalen Aminosäuren in den einzelnen Vorstufenfraktionen aus seringehemmten Zellen (0.3%) von *L. cello-biosus* (Glu = 1)

Fraktion	μmol	Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	Orn	Lys	D-Ser	L-Ala	D-Ala	C-terminal D-Ser Ala	Vorstufe
I	4.5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-MurNac
II	2.0	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-GlcNac
III	14.0	0.92	-	0.88	1.0	0.86	0.12	0.96	0.85	-	0.90	UDP-MurNac- Tetrapeptid I
IV	2.8	1.00	-	0.99	1.0	0.87	0.10	0.81	0.96	-	0.80	UDP-MurNac- Tetrapeptid II

3.7. Die Wirkung von D-Serin auf das Murein von *Staphylococcus aureus* Stamm Copenhagen

Die Zellwand von *Staph. aureus* wurde bereits eingehend untersucht (Mandelstam und Strominger 1961). Das Murein von *Staph. aureus* gehört dem L-Lys-Gly₅-Typ an. (Abb. 10)

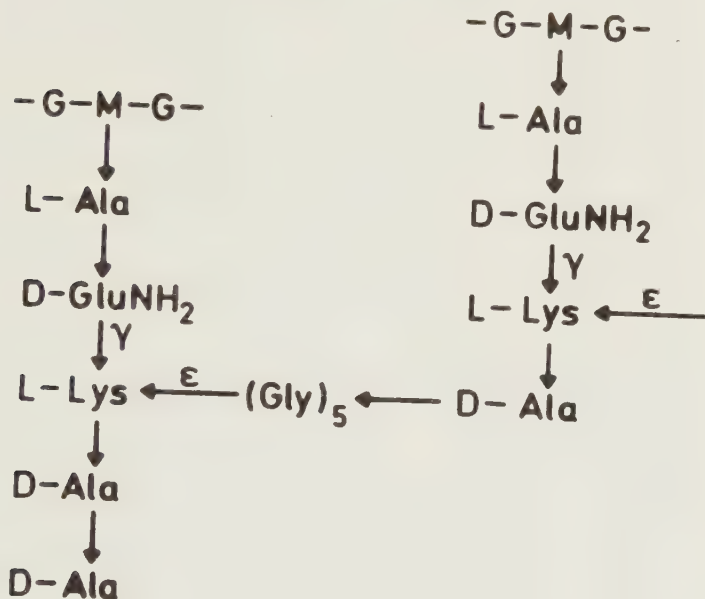


Abb. 10 Primärstruktur eines Mureinfragments von *Staph. aureus* (L-Lys-Gly₅-Mureintyp)

Ein Vergleich (Tab. 13) der molaren Verhältnisse in den Zellwänden von ungehemmten und mit 0.5% D-Serin gehemmten Zellen zeigt, daß die Abnahme im Alaningehalt durch den Einbau von 0.35 Mol D-Serin ausgewogen wird. Der Glycingehalt

Tab. 13 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäuren und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von Staph. aureus (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen (0.5% D-Ser)

Molare Verhältnisse										C-terminal			N-terminal ⁺			Quervernetzungsrate in %	Hemmung der Quervernetzungsrate gegenüber der Kontrolle in %
	Mur	GlcNH ₂	Glu	Lys	L-Ala	D-Ala	Gly	D-Ser	Ala	Gly	D-Ser	Ala	Gly	Lys			
a	0.88	1.08	1.0	0.97	1.0	1.14	5.15	-	0.11	0.16	-	0.10	0.25	-		75	20
b	1.10	1.13	1.0	0.95	1.0	0.85	5.10	0.35	0.05	0.17	0.19	0.09	0.35	0.06		60	

+ bestimmt durch Photometrie der DNP-Aminosäuren

bleibt mit 5.10 Mol in beiden Zellwänden konstant.

Die Bestimmung der Quervernetzung kann wegen des hohen Glycingehalts nicht durch Differenzbildung erfolgen. In diesem Fall liefert nur die photometrische Bestimmung des N-terminalen Glycins hinreichend genaue Ergebnisse.

Für die Kontrollzellwand ergibt sich aus der photometrischen Bestimmung des N-terminalen Glycins eine Quervernetzungsrate von 75%.

Die chromatographische Bestimmung der hydrolysierten DNP-Zellwände aus seringehemmten Zellen ergab an N-terminalen Aminosäuren Alanin, Glycin und Lysin. Aus der photometrischen Endgruppenbestimmung errechnet sich eine Quervernetzungsrate von ca. 60%.

Neben Alanin und Glycin erwies sich der Hauptanteil des eingebauten D-Serins (0.19 Mol) als C-terminal.

Das Vorkommen von N-terminalem Alanin ist auf die Tätigkeit einer autolytischen Amidase zurückzuführen (Tipper 1969). Diese hydrolysiert die Bindung zwischen dem Peptid und dem Zuckeranteil. Für das Glycin, das bei der Hydrazinolyse C-terminal auftritt, muß die Aktivität einer Endopeptidase verantwortlich gemacht werden. Das Wachstum der Zellen in Gegenwart von D-Serin bewirkt eine Abnahme im Quervernetzungsgrad. Gegenüber der Kontrolle ist die Quervernetzung um etwa 1/5 (20%) schlechter realisiert.

3.7.1. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Die Zellen wurden in der logarithmischen Phase mit 0.5% D-Serin gehemmt und nach 90 Minuten geerntet. Aus dem

TES-Extrakt konnten nach Sephadex-Gelfiltration und zweimaliger Papierchromatographie folgende Mureinvorstufen isoliert werden (Berechnungsbasis Muraminsäure):

UDP-MurNac	6.0 / μ mol
UDP-GlcNac	5.1 / μ mol
UDP-MurNac-Tripeptid	1.5 / μ mol
UDP-MurNac-Pentapeptid	5.4 / μ mol

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Vorstufenfraktionen ist in Tab. 14 zusammengestellt. Das Pentapeptid wurde näher untersucht.

In 1 Mol des Pentapeptides wurden 0.80 Mol D-Serin eingebaut. Durch die Hydrazinolyse wurde die Hälfte (0.42 Mol) C-terminal gefunden. Demnach muß sich der Rest (0.38 Mol) in Position 4 befinden.

Diese Verteilung konnte auch durch die Partialhydrolyse bestätigt werden. Im Chromatogramm eines sauren Partialhydrolysats konnte das Peptid D-Ser-D-Ala gefunden werden.

Die Verteilung des D-Serins in den Mureinvorstufen stimmt mit den Ergebnissen der Hydrazinolyse der fertigen Zellwand überein. Von den eingebauten 0.35 Mol D-Serin wurde etwa die Hälfte (0.19 Mol) C-terminal gefunden. Der Rest (0.16 Mol) muß sich in Position 4 der Peptiduntereinheit befinden.

Tab. 14 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminozucker und der C-terminalen Aminosäuren in den einzelnen Vorstufenfraktionen aus seringehemmten Zellen (0.5%) von Staph.aureus (Glu = 1)

Fraktion	/umol	Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	Lys	D-Ser	L-Ala	D-Ala	C-terminal		Vorstufe
										D-Ser	D-Ala	
I	6.0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-MurNac
II	5.1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-GlcNac
III	1.5	1.20	-	0.88	1.0	0.97	-	0.85	-	-	-	UDP-MurNac-Tripeptid
IV	5.4	1.21	-	2.1 ⁴	1.0	0.90	0.80	0.98	1.15	0.42	0.52	UDP-MurNac-Pentapeptidgemisch

3.8. Der Einfluß von D-Serin auf das Murein von *Corynebacterium insidiosum*

Die Mureinstruktur von *C. insidiosum* wurde von Perkins (1968) geklärt. Das Murein gehört dem D-Glu-D-DAB-Typ an. Es enthält in Position 1 ein Mol Glycin und 2.4-L-Diaminobuttersäure als Diaminosäure. Die Quervernetzung erfolgt über die α -Carboxylgruppe der D-Glutaminsäure und dem D-Alanin einer benachbarten Peptiduntereinheit durch D-DAB als Interpeptidbrücke.

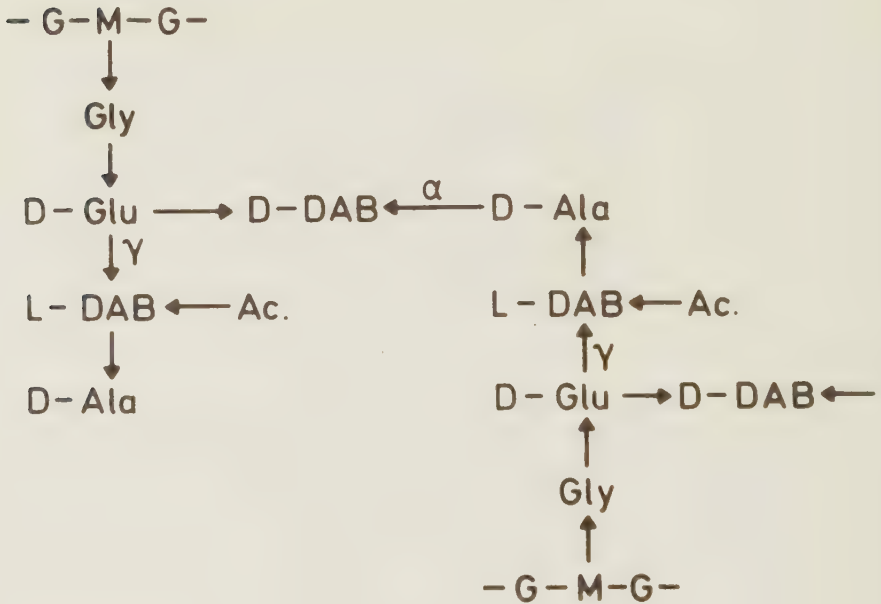


Abb. 11 Primärstruktur eines Mureinfragments von *C. insidiosum*

Im Vorversuch wurde die Empfindlichkeit gegenüber D-Serin untersucht. Bei einem Zusatz von 0.25% D-Serin zum Medium erfolgte eine Wachstumshemmung um 50%. Mit 0.5% D-Serin waren die Zellen vollständig lysiert. Unter dem Einfluß von D-Serin wurde auch die Morphologie verändert. Die Zellen waren gegenüber der Kontrolle vergrößert und stark verzweigt.

Die Zellwände wurden aus Zellen gewonnen, die mit 0.25% D-Serin gehemmt waren. Die Ergebnisse der Zellwandanalyse sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Ein Vergleich von Zellwänden gehemmter und ungehemmter Zellen (Hammes 1972) zeigt, daß unter dem Einfluß von D-Serin zusätzlich ein Einbau von 0.51 Mol D-Serin in das Murein erfolgt. Der Alaningehalt verändert sich gegenüber der Kontrolle nicht. Da fast das gesamte D-Serin (0.48 Mol) bei der Hydrazinolyse C-terminal gefunden wird, muß man annehmen, daß es sich vollständig in Position 5 der Peptiduntereinheit befindet. Die Position 4 wird ausschließlich von D-Alanin besetzt.

Der Einbau von D-Serin in die Position 5 der Peptiduntereinheit war jedoch ebenfalls von einer Verminderung in der Quervernetzungsrate begleitet. An N-terminaler Aminosäure wurde durch Differenzbildung 0.56 Mol und durch Photometrie 0.61 Mol DAB gefunden. Bei der Berechnung der Quervernetzung muß berücksichtigt werden, daß die Substitution der α -Carboxylgruppe der Glutaminsäure mit Interpeptidbrücken nicht vollständig ist. Es liegen 0.06 Mol freie α -Carboxylgruppen vor (Tab. 15). Unter Berücksichtigung dieser freien α -Carboxylgruppen ergeben sich Quervernetzungsdaten von 38 bzw. 33%.

Tab.15 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosucker und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von *C. insidiosum* (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen (0.25% D-Ser)

Molare Verhältnisse										C-terminal			N-terminal	Quervernetzungsrate in %	Hemmung der Quervernetzungsrate gegenüber der Kontrolle in %
	Mur	GlcNH ₂	Glu	DAB	Ala	Gly	D-Ser	Ala	DAB	D-Ser	DAB ⁺	Quervernetzungsrate in %			
a	0.90	1.46	1.0	1.92	0.95	1.00	-	0.34	1.14	-	0.45	47	26		
b	0.97	0.97	1.0	1.94	0.98	1.06	0.51	0.18	0.91	0.48	0.59	35			

+ Mittelwert aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen in ZW-TRYP und DNP-ZW und der photometrischen Bestimmung der DNP-Aminosäuren

Aus dem Anteil der nicht C-terminalen Aminosäuren ergibt sich eine Quervernetzungsrate von 32%. (Gesamtalanin 0.98 Mol, - 0.18 Mol C-terminales Alanin + 0.48 Mol C-terminales D-Serin = 0.32 Mol).

Aus den N-terminalen Aminosäuren, die durch Differenzbildung und durch Photometrie ermittelt wurden, errechnet sich eine durchschnittliche Quervernetzungsrate von 35%. Das bedeutet gegenüber der 47%-igen Quervernetzung in der Kontrolle eine Verschlechterung um $1/4$ (26%).

Der Mureintyp von *M. lysodeikticus* ist dadurch gekennzeichnet, daß ein vollständiges Pentapeptid als Interpeptidbrücke dient. Das zusätzliche Glycin ist an die α -Carboxylgruppe der Glutaminsäure gebunden. Ein Teil der Muraminsäure (etwa 50%) liegt unsubstituiert vor. Von Ghuysen et al. (1968) konnte gezeigt werden, daß an der Interpeptidbrücke bis zu drei Pentapeptide beteiligt sein können.

Der Einfluß von D-Serin auf das Murein von *M. lysodeikticus* wurde bereits von Whitney und Grula (1968) untersucht. Sie fanden, daß der Gehalt an Glycin unter dem Einfluß von D-Serin abnimmt und daß D-Serin an Stelle von Glycin in das Murein eingebaut wird. Etwa 75 - 80% des eingebauten D-Serins konnte durch die Hydrazinolyse als C-terminal gefunden werden.

Ein Einbau des restlichen D-Serins in einer anderen Position der Peptiduntereinheit wurde durch die Untersuchung dieser Autoren nicht ausgeschlossen. Es lag auf Grund unserer Befunde an anderen Organismen nahe, den Einfluß von D-Serin auf das Murein daher nochmals zu untersuchen. Durch die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren, der Alaninkonfiguration und der Untersuchung von Partialhydrolysaten und von nukleotidaktivierten Mureinvorstufen sollte ein abschließendes Bild über die Serinwirkung auf *M. lysodeikticus* gewonnen werden.

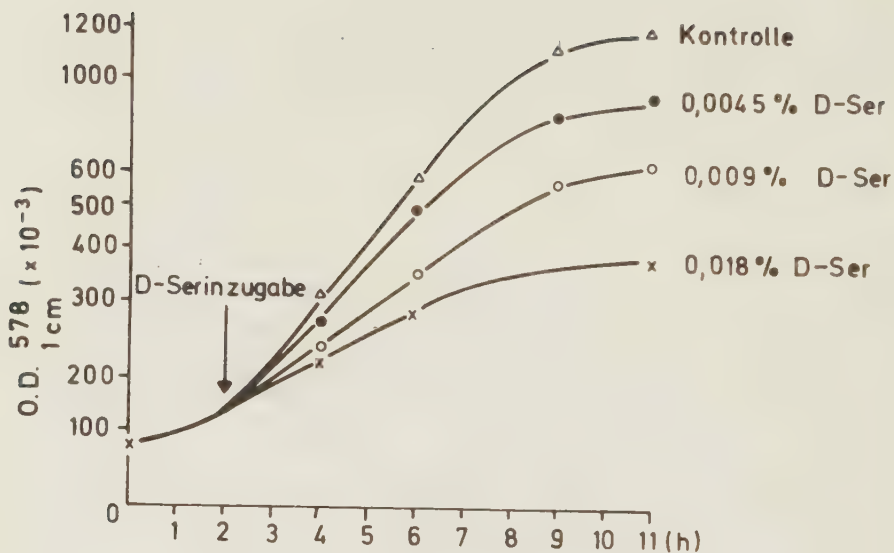


Abb. 13 Wachstumskurve von *M. lysodeikticus* mit unterschiedlichen D-Serinkonzentrationen

Wie die Wachstumskurve zeigt (Abb. 13) ist *M. lysodeikticus* gegenüber D-Serin extrem empfindlich. Schon bei 0.018% D-Serin ist das Wachstum zu 70% gehemmt.

3.9.1. Der Einfluß von weiteren D-Aminosäuren auf das Wachstum von *M. lysodeikticus*

Da das Wachstum von *M. lysodeikticus* bei Konzentrationen über 0.02% D-Serin vollständig gehemmt war, sollte untersucht werden, ob auch gegenüber Glycin und anderen D-Aminosäuren eine so hohe Empfindlichkeit besteht. Wie die Wachstumskurven in den Abbildungen 14 und 15 zeigen, nimmt die wachstumshemmende Wirkung in der Reihenfolge D-Serin - Glycin - D-Threonin - D-Leucin - D-Valin ab.

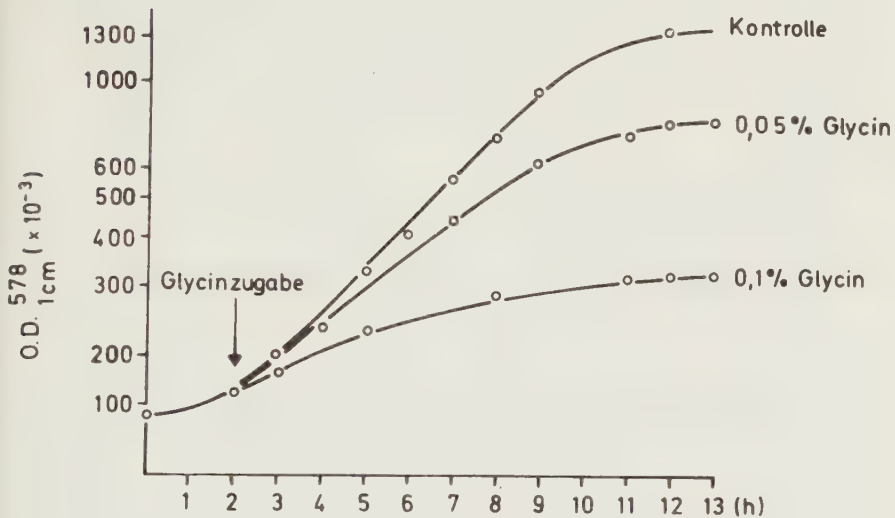


Abb. 14 Wachstumskurve von *M. lysodeikticus* mit unterschiedlichen Glycinkonzentrationen

Mit 0.05% Glycin war das Wachstum zu 40% gehemmt. In Gegenwart von 0.05% D-Threonin trat eine 30%-ige Wachstumsverminderung ein. Gegen D-Leucin und D-Valin ist der Organismus etwas resistenter. Durch 0.1% D-Leucin bzw. D-Valin war das Wachstum zu 40 bzw. 50% gehemmt.

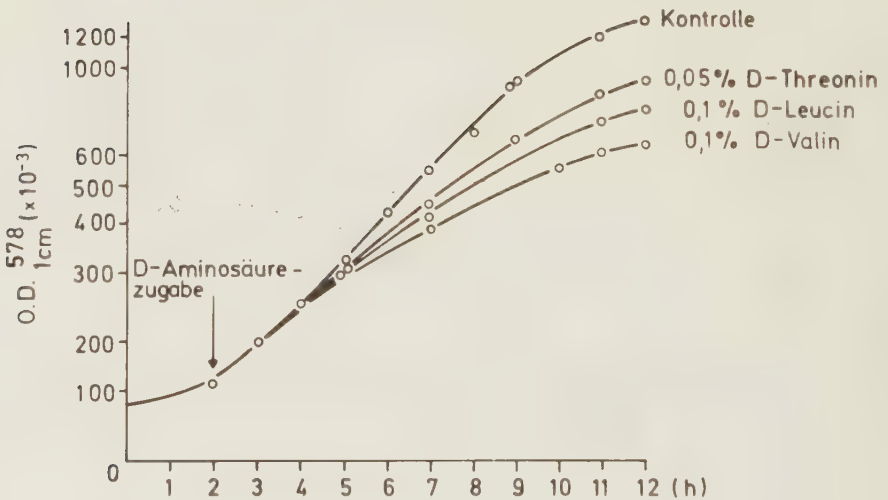


Abb. 15 Wachstumskurve von *M. lysodeikticus* mit unterschiedlichen Konzentrationen an D-Aminosäuren

3.9.2. Untersuchung des Mureins von gehemmten Zellen

Ein Vergleich zwischen normalen und seringehemmten Zellen (0.02%) zeigt, daß in Gegenwart von D-Serin ein Einbau von 0.16 Mol D-Serin in das Murein von *M. lysodeikticus* erfolgt. Gleichzeitig geht der Gehalt an Glycin von 0.94 Mol auf 0.87 Mol zurück. Der Alaningehalt bleibt mit 2 Mol pro Mol Muropeptid in beiden Zellwänden konstant. (Tab. 16)

Die Konfigurationsbestimmung ergab zu gleichen Teilen L- und D-Alanin. Das eingebaute D-Serin wurde durch diese Behandlung vollständig zerstört.

Die Berechnung der Quervernetzungsrate erfolgt bei diesem Mureintyp durch die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren. Bei der Hydrazinolyse wurde in der Kontrollzellwand neben Glycin, das vollständig C-terminal war, 0.05 Mol Alanin gefunden. Das entspricht einer Quervernetzungsrate von 95%.

Der Wert des N-terminalen Lysins kann für die Berechnung der Quervernetzungsrate nicht herangezogen werden, da die ϵ -Aminogruppe des Lysins in der Peptiduntereinheit frei vorliegt und voll dinitrophenylierbar ist.

In dem geschädigten Murein wurde das eingebaute D-Serin fast vollständig C-terminal gefunden. Aus diesem Grunde muß man annehmen, daß das D-Serin das an die α -Carboxylgruppe der Glutaminsäure gebundene Glycin zu ersetzen vermag.

Neben Glycin sind bei der Hydrazinolyse 0.32 Mol Alanin und 0.13 Mol Lysin C-terminal. Aus der Summe der C-terminalen Aminosäuren errechnet sich eine Quervernetzungsrate von 55%. Das geschädigte Murein ist somit um 42% schlechter vernetzt.

Tab. 16 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosäuren und der C- und N-terminalen Aminosäuren in den Zellwänden von M. Lyodeikticus (Glu = 1)

a) Kontrolle b) gehemmte Zellen (0.02% D-Ser) c) gehemmte Zellen (0.3% D-Ser)

Molare Verhältnisse										C-terminal			N-terminal ⁺		Quervernetzungsrate in %	Hemmung der Quervernetzungsrate gegenüber d.Kontr in %
	Mur	GlcNH ₂	Glu	Lys	L-Ala	D-Ala	Gly	D-Ser	Lys	Ala	Gly	D-Ser	Lys	Ala		
a	1.18	0.89	1.0	0.96	1.0	1.03	0.94	-	-	0.05	0.94	-	0.83	0.06		-
b	1.56	1.38	1.0	0.98	1.0	1.01	0.87	0.16	0.13	0.32	0.83	0.15	0.85	0.03		42
c	1.58	1.51	1.0	0.97	1.0	0.96	0.64	0.39	0.21	0.38	0.60	0.35	0.85	0.03		57

+ bestimmt aus der Differenz zwischen den molaren Verhältnissen in ZW-TRYP und DNP-ZW

Da der Anteil an eingebautem D-Serin mit 0.16 Mol ziemlich niedrig war, wurde der Versuch unternommen, mit höheren Konzentrationen einen erhöhten Einbau von D-Serin in das Murein zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurden logarithmisch wachsende Zellen 90 Minuten lang mit 0.3% D-Serin gehemmt und anschließend geerntet. Die Ergebnisse der Zellwandanalyse sind in Tab. 16 zusammengestellt.

Der Gehalt an Glycin geht von 0.94 Mol auf 0.64 Mol zurück und wird durch den Einbau von 0.39 Mol D-Serin ausgeglichen.

Der Alaningehalt verändert sich gegenüber der Kontrolle nicht. Die Konfigurationsbestimmung ergab wiederum gleiche Teile L- und D-Alanin. Das eingebaute D-Serin wurde bei dieser Bestimmung vollständig zerstört.

Mit Hilfe der Hydrazinolyse wurden wiederum die C-terminalen Aminosäuren bestimmt. Das eingebaute D-Serin ist praktisch vollständig C-terminal (0.35 von 0.39Mol) Aus diesem Ergebnis muß gefolgert werden, daß auch bei höheren D-Serinkonzentrationen nur Glycin durch D-Serin ersetzt wird.

Aus den übrigen C-terminalen Aminosäuren (0.38 Mol Alanin und 0.21 Mol Lysin) errechnet sich eine Quervernetzungsrate von 41%. Das geschädigte Murein ist somit um 57% schlechter vernetzt als die Kontrollzellwand.

Einen direkten Aufschluß über die Lokalisierung des D-Serins in der Peptiduntereinheit liefert die Analyse des Partialhydrolysats (Abb. 16). Da Peptide mit C-terminalen Hydroxyaminosäuren im Sauren nicht stabil sind, konnte das Peptid Glu-D-Ser nur unter den Bedingungen der alkalischen Partialhydrolyse (4n NaOH/ 60°/15 Min.) isoliert werden. Das Auftreten dieses

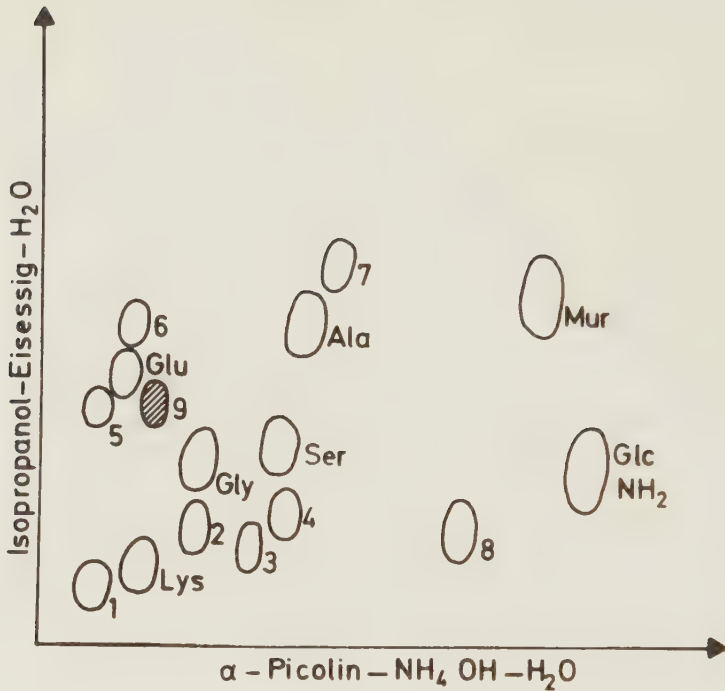


Abb. 16 Schema eines zweidimensionalen Papierchromatogramms eines Partialhydrolysates (4n HCl/100°C/40 Min) der Zellwand von *M. lysodeikticus* (mit 0.3% D-Ser gehemmt)

1 = Glu-Lys, 2 = Lys-D-Ala, 3 = N⁶-D-Ala-Lys, 4 = N⁶-D-Ala-Lys-D-Ala, 5 = Glu-Gly, 6 = Ala-Glu, 7 = D-Ala-L-Ala, 8 = Mur-GlcNH₂

Peptid 9 (schraffiert) als Ergänzung aus alkalischer Partialhydrolyse (4n NaOH/60°C/15 Min) hinzugefügt = Glu-D-Ser

Peptids liefert einen weiteren Beweis für die Tatsache, daß D-Serin an Stelle von Glycin in das Murein eingebaut wird.

Die Peptide Lys-D-Ser oder D-Ser-L-Ala, die für einen Einbau in Position 4 der Peptiduntereinheit sprächen, wurden dagegen im Chromatogramm eines Partialhydrolysates nicht gefunden.

Ein Vergleich der Zellwandanalysen der gehemmten Zellen mit der Kontrolle zeigt überdies, daß unter dem Einfluß von D-Serin der Anteil an Muraminsäure und Glucosamin erhöht ist (1.5 Mol/Mol Glu). Man muß daher annehmen, daß in dem geschädigten Murein ein Teil der Interpeptidbrücken fehlt.

3.9.3. Untersuchung der unter dem Einfluß von D-Serin angereicherten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen

Die Untersuchungsergebnisse ergaben, daß in dem geschädigten Murein nur Glycin durch D-Serin ersetzt ist. Aus diesem Grunde ließen die Vorstufen aus seringehemmten Zellen keinen Einbau von D-Serin erwarten.

Im Vorversuch wurde zunächst die Anreicherung von N-Acetylaminozuckern in Abhängigkeit von der D-Serinkonzentration und der optischen Dichte der Kultur gemessen. Wie aus der Abb. 17 ersichtlich ist, erfolgt bei 0.01% D-Serin eine 2 1/2-fache Anreicherung von N-Acetylaminozuckern.

Die Vorstufen wurden aus dem Kochextrakt der Zellen gewonnen, aus denen auch die Zellwände isoliert wurden (0.3% D-Serin). Es handelt sich somit um die Vorstufen, die bei der Bildung des Mureins vorlagen.

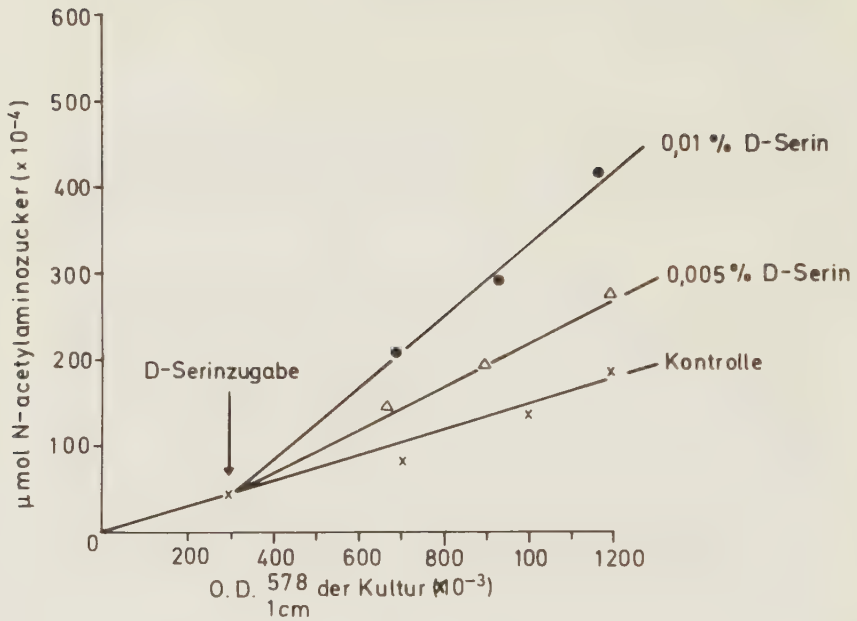


Abb. 17 Anreicherung von N-Acetylaminosuktern unter dem Einfluß von D-Serin

Aus 10 l Kultur wurden nach Sephadex-Gelfiltration und zweimaliger Papierchromatographie in den Laufmitteln VI und VII folgende Mureinvorstufen isoliert (Berechnungsbasis Muraminsäure):

UDP-MurNac	1,08 μmol
UDP-GlcNac	4,46 μmol
UDP-MurNac-Tetrapeptid	1,28 μmol

Die Zusammensetzung der einzelnen Vorstufenfraktionen zeigt die Tab. 17.

Tab. 17 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminosucker und der C-terminalen Aminosäuren in den einzelnen Vorstufenfraktionen aus seringehemmten Zellen (0.3%) von *M. lyso-deikticus* (Glu = 1)

Fraktion	μmol	Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	Lys	D-Ser	L-Ala	D-Ala	C-terminal D-Ser D-Ala	Vorstufe
I	1.08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	UDP-MurNac
II	4.46	-	+	-	-	-	-	-	-	-	UDP-GlcNac
III	1.28	0.86	-	1.36	1.0	0.85	0.66	1.00	0.35	0.60 0.30	UDP-MurNac- Tetrapeptid- gemisch

In ein Mol des Tetrapeptides wurden 0.66 Mol D-Serin eingebaut. Die Hydrozinalyse ergab, daß das eingebaute D-Serin praktisch vollständig C-terminal war.

Die Anreicherung von UDP-MurNac-Tetrapeptiden, die Alanin und D-Serin enthalten, ist entweder eine Besonderheit, die durch D-Serin verursacht wird oder auf die Aktivität einer Carboxypeptidase zurückzuführen, die eine bevorzugte Affinität zu serinhaltigen Pentapeptiden mit D-Serin in Position 4 hat. Die serinhaltigen Tetrapeptide werden beim Einbau offensichtlich vollständig diskriminiert, denn in der fertigen Zellwand ist nur Glycin durch D-Serin ersetzt.

Da die Zellwand jedoch 2 Mol Alanin enthält, müssen auch normale UDP-MurNac-Pentapeptide vorkommen, die unter unseren Versuchsbedingungen jedoch nicht gefunden wurden.

3.9.4. Untersuchung der unter dem Einfluß von Penicillin angereicherten Mureinvorstufen

Nachdem bei *M. lysodeikticus* in Gegenwart von D-Serin serinhaltige UDP-MurNac-Tetrapeptide angereichert wurden, die vom Einbau vollständig diskriminiert wurden, wurden auch Vorstufen aus penicillingehemmten Zellen untersucht. Die Zellen wurden in der logarithmischen Phase mit Penicillin G (10 i.E./ml) gehemmt und nach 90 Minuten geerntet. Nach TES-Extraktion, Sephadex-Gelfiltration und zweimaliger Papierchromatographie in den Laufmitteln VI und VII fielen aus 14 l Kultur folgende Vorstufen an (Berechnungsbasis Muraminsäure):

UDP-MurNac	0.71 / μ mol
UDP-GlcNac	5.50 / μ mol
UDP-MurNac-Tripeptid	0.16 / μ mol
UDP-MurNac-Pentapeptid	1.58 / μ mol

Tab. 18 Molare Verhältnisse der Aminosäuren, der Aminozucker und der C-terminalen Aminosäuren in den einzelnen Vorstufenfraktionen aus penicillingeheimmten Zellen (10. i.E./ml) von *M. lysodeikticus* (Glu = 1)

Fraktion	μmol	Mur	GlcNH ₂	Ala	Glu	Lys	L-Ala	D-Ala	C-terminal D-Ala	Vorstufe
I	0.71	+	-	-	-	-	-	-	-	UDP-MurNac
II	5.50	-	+	-	-	-	-	-	-	UDP-GlcNac
III	0.16	0.88	-	0.85	1.0	0.90	0.85	-	-	UDP-MurNac-Tripeptid
IV	1.58	1.17	-	3.14	1.0	0.89	1.00	2.14	1.10	UDP-MurNac-Pentapeptid

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Vorstufenfraktionen ist in der Tab. 18 zusammengestellt. Bei dem isolierten UDP-MurNac-Pentapeptid handelt es sich um die normale Mureinvorstufe, wie sie von der Biosynthese des Mureins bekannt ist, aber im Falle von *M. lysodeikticus* bisher noch nicht isoliert wurde.

4. Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß in Gegenwart wachstumshemmender Konzentrationen an D-Aminosäuren stets folgende Veränderungen gemeinsam auftraten (die wichtigsten Daten sind in Tab. 19 zusammengestellt):

1. Das D-Alanin in der Peptiduntereinheit des Mureins wurde teilweise durch andere D-Aminosäuren ersetzt.
2. Der Quervernetzungsgrad war herabgesetzt.
3. Unter dem Einfluß von D-Serin wurden nukleotidaktivierte Mureinvorstufen angereichert, bei denen D-Alanin durch D-Serin ersetzt war.

Diese Wirkungen entsprechen demnach ganz denen, die unter Glycineinwirkung (Hammes 1972) gefunden wurden. Die Organismen lassen sich je nach der Zusammensetzung der Vorstufengemische in zwei Gruppen einteilen.

Die erste Gruppe umfaßt *C. callunae*, *B. subtilis* und *Staph. aureus*. In diesen Organismen wurden Pentapeptide angereichert, in denen die Positionen 4 und 5 in unterschiedlichem Ausmaß durch D-Serin besetzt sind. Auf den folgenden Stufen der Mureinbiosynthese, der Translokation auf die Lipidstufe und der Übertragung auf das Glykan, werden die serinhaltigen Vorstufen offensichtlich z. T. diskriminiert, denn der Gehalt an D-Serin ist in der Zellwand niedriger als in den Vorstufengemischen. Ein Vergleich des Anteils an C-terminalem D-Alanin und D-Serin zeigt, daß prozentual mehr D-Serin C-terminal ist als D-Alanin. Ein großer Teil der eingebauten "falschen" Vorstufen liegt somit als unvernetzte Peptiduntereinheit vor. Diese Tatsache spricht für eine weitere Diskriminierung auf der Stufe der Transpeptidierung.

Tab. 19 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse aus den Untersuchungen über den Einfluß von verschiedenen D-Aminosäuren auf das Murein von wachsenden Zellen.

Organismus	Mureintyp	D-Aminosäure	Konz. an D-Aminosäure in %	Fremde D-Aminosäure im Murein Mol/Mol Glu				Quervernetzungsrate i. %	Fremde D-Aminosäuren in d. Vorstufen Mol/Mol Glu	
				D-Ser	D-Thr	D-Val	D-Leu	D-Met	gesamt	Pos. 4
<i>B. subtilis</i>	m-Dpm-dir	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		D-Ser	0.2	0.32	-	-	-	-	1.31	0.49
		D-Thr	0.3	-	0.11	-	-	-	-	-
		D-Val	0.5	-	-	0.18	-	-	-	-
		D-Leu	0.5	-	-	-	0.15	-	-	-
<i>C. callunae</i>	m-Dpm-dir	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		D-Ser	0.3	0.46	-	-	-	-	1.39	0.72
		D-Thr	0.3	-	0.16	-	-	-	-	-
		D-Val	0.5	-	-	0.19	-	-	-	-
		D-Leu	0.5	-	-	-	0.20	-	-	-
		D-Thr	2.5	-	0.39	-	-	-	-	-
		D-Val	2.5	-	-	0.29	-	-	-	-
		D-Leu	2.5	-	-	-	0.39	-	-	-
		D-Met	2.5	-	-	-	-	0.31	-	-

Tab. 19 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse aus den Untersuchungen über den Einfluß von D-Serin auf das Murein von wachsenden Zellen

Organismus	Mureintyp	Konzentration an D-Serin in %	D-Seringehalt im Murein Mol/ Mol Glu	Quervernetzungsrate in %	D-Seringehalt in den Vorstufen Mol/Mol Glu		
					gesamt	Pos. 4	Pos. 5
Arthrobacter spec.	m-Dpm-direkt	- 0.40	- 0.35	75 52	- -	- -	- -
L. plantarum	m-Dpm-direkt	- 0.50	- 0.28	51 33	- 0.74	- 0.74 ⁺	- -
L. cellobiosus	L-Lys-D-Asp	- 0.30	- 0.27	57 28	- 0.96	- 0.96 ⁺	- -
Staph. aureus	L-Lys-(Gly) ₅	- 0.50	- 0.35	75 60	- 0.80	- 0.38	- 0.42
C. insidiosum	D-Glu-D-DAB	- 0.25	- 0.51	47 35	- -	- -	- -
M. lysodeikticus	L-Lys-Peptiduntereinheit	- 0.02 0.30	- 0.16 0.39	95 55 41	- - 0.66	- - 0.60 ⁺	- - -

+ UDP-MurNac-Tetrapeptid

Normale Vorstufen mit D-Ala-D-Ala am C-Terminus wurden unter unseren Versuchsbedingungen nicht gefunden. Man muß jedoch annehmen, daß sie vorkommen und gegenüber den serinhaltigen Vorstufen bei der Translokation auf den Zellwandakzeptor und der anschließenden Transpeptidierung bevorzugt verwendet werden. Daher liegen sie wohl in einem sehr kleinen, von uns nicht fassbaren Pool vor.

Diese Ergebnisse waren nach den Untersuchungen von Neuhäus und Struve an *Str. faecalis* (1965) nicht zu erwarten. Diese Autoren hatten gefunden, daß die D-Ala-D-Ala Synthetase nur D-Ala-X verwendet (X = Gly, D-Ser, D-Leu), während die UDP-MurNac-L-Ala-D-Glu-L-Lys : D-Ala-D-Ala Ligase nur X-D-Ala verwendet. Demnach sollte die Entstehung von Peptiden mit "falscher" D-Aminosäure in Position 4 und 5 nicht möglich sein. Unsere in vivo Untersuchungen zeigten jedoch, daß bei den hier untersuchten Organismen diese Peptide offensichtlich sehr gut gebildet werden. In den Vorstufen von *B. subtilis* ist zwar der überwiegende Teil des D-Serins in Position 5 eingebaut, bei *C. callunae* und *Staph. aureus* ist aber das eingebaute D-Serin praktisch gleichmäßig auf die Positionen 4 und 5 verteilt.

Somit liegen hinsichtlich der Synthese der Dipeptide und deren weiterer Verwendung bei unseren Organismen in vivo andere Verhältnisse als bei den enzymatischen in vitro Untersuchungen bei *Str. faecalis* vor. Die unterschiedlich starke Besetzung der Positionen 4 und 5 mit D-Serin spricht für eine Verschiedenheit der Substratspezifität der Enzyme bei den einzelnen Bakterienarten.

Zur zweiten Gruppe gehören *L. cellobiosus*, *L. plantarum* und *M. lysodeikticus*, die unter D-Serinwirkung UDP-MurNac-Tetrapeptide anreichern, in denen die Position 4 mit D-Serin und D-Alanin besetzt ist.

Diese drei Organismen verhalten sich jedoch insofern unterschiedlich, als bei *L. cellobiosus* und *L. plantarum* auch ohne Serineinwirkung UDP-MurNac-Tetrapeptide, dann allerdings mit C-terminalem D-Alanin, gebildet werden, während bei *M. lysodeikticus* nach Penicillinhemmung normale Pentapeptide gefunden wurden.

Für das Auftreten von UDP-MurNac-Tetrapeptiden bei *L. cellobiosus* und *L. plantarum* kann die Aktivität einer Carboxypeptidase verantwortlich sein, die von dem UDP-MurNac-Pentapeptid die C-terminale Aminosäure abspaltet. Dieses lösliche Enzym wurde von Izaki und Strominger (1968) aus *E. coli* isoliert und hat eine bevorzugte Affinität zu nukleotidaktivierten Pentapeptiden, greift aber unvernetztes Murein kaum an. Der Einbau der unvollständig gewordenen Vorstufen führt dann zu einer indirekten Hemmung der Quervernetzung, da die Peptiduntereinheiten nicht mehr der Transpeptidierung unterworfen werden können. Eine solche Regulierung der Quervernetzung durch die Aktivität einer Carboxypeptidase nehmen auch Ghuysen und Shockman (1972) an. Nach ihren Vorstellungen werden die UDP-MurNac-Pentapeptide eingebaut und erst vor der Quervernetzung verkürzt, während wir annehmen, daß schon die nukleotidaktivierten Vorstufen durch die Carboxypeptidase gespalten werden.

Da bei *M. lysodeikticus* in Gegenwart von Penicillin normale Vorstufen gebildet werden, ist die Anreicherung serinhaltiger Tetrapeptide eine Besonderheit, die entweder durch D-Serin verursacht wird oder auf die Aktivität einer Carboxypeptidase zurückzuführen ist, die Pentapeptide mit D-Serin in Position 4 bevorzugt spaltet.

Die Zellwände weisen weder in Position 4 noch in Position 5 D-Serin auf. Lediglich die α -Carboxylgruppe der Glutaminsäure ist durch D-Serin ersetzt.

Außerdem besitzen die Zellwände eine geringere Quervernetzung und einen erheblichen Überschuß von Muraminsäure und Glucosamin gegenüber Glutaminsäure und Lysin. Die letztere Abweichung wurde bei den anderen Organismen nicht gefunden und kann wohl nur mit dem speziellen Mechanismus der Quervernetzung bei *M. lysodeikticus* in Zusammenhang gebracht werden.

Nach den Vorstellungen von Schleifer und Kandler (1967b) und Ghuyssen et al. (1968) wird nach der Polymerisierung der Disaccharid-Pentapeptidvorstufen zunächst bei einer Anzahl von Untereinheiten eine direkte Quervernetzung zwischen dem vorletzten D-Alanin und der ϵ -Aminogruppe des Lysins einer benachbarten Peptiduntereinheit hergestellt, wie dies auch bei anderen Organismen der Fall ist. Dann soll eine Amidase die Bindung von L-Alanin an die Muraminsäure lösen und damit ein neues N-terminales Ende schaffen, an das die noch vorhandenen Pentapeptiduntereinheiten durch erneute Transpeptidierung geknüpft werden. Damit ist die ehemalige Peptiduntereinheit zur Interpeptidbrücke geworden. Das Verhältnis von D-Glu : Mur bleibt aber unverändert, da ja keine Untereinheiten verloren gehen.

Unter dem Einfluß von D-Serin könnte es zu folgender Variation kommen. Neben den normalen Vorstufen werden auch die UDP-MurNac-Tetrapeptide eingebaut, sie können aber nicht mit dem C-Terminus an die ϵ -Aminogruppe des Lysins gebunden werden und bleiben unvernetzt. Trotzdem könnte nun die Amidase wie bei den normalen Untereinheiten die Bindung zwischen Muraminsäure und L-Alanin lösen.

Damit kommt es zum Verlust des Tetrapaptides, das ja wegen der fehlenden Bindung an die ϵ -Aminogruppe des Lysins nicht durch erneute Transpeptidierung zur Interpeptidbrücke werden kann. Das Ergebnis ist ein Murein, das sowohl alles D-Serin wieder verloren hat als auch einen Überschuß von Aminosackern gegenüber Peptiduntereinheiten und damit auch gegenüber D-Glutaminsäure aufweist. Diese Hypothese bedarf jedoch der näheren experimentellen Überprüfung.

Ob der Ersatz von Glycin an der α -Carboxylgruppe der Glutaminsäure durch D-Serin eine Rolle für die Stabilität des Mureins spielt, kann nicht gesagt werden.

Auch über den Einbau von Vorstufen mit "falscher" D-Aminosäure in Position 5 kann nichts ausgesagt werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß sie eingebaut und auch quervernetzt werden, wodurch das C-terminale D-Serin verloren geht. Hierfür sprechen die Untersuchungen von Leyh-Bouille et al. (1970), die die Substratspezifität der Carboxypeptidase aus *Streptomyces albus* untersuchten. Demnach sind alle Peptide mit der Sequenz D-Ala-X (X = Gly, D-Ser, D-Leu) ein gutes Substrat für dieses Enzym. Vorstufen mit "falscher" D-Aminosäure in Position 5 werden auch normal vernetzt und die "falsche" D-Aminosäure wird durch Carboxypeptidase und Transpeptidase aus dieser Position entfernt. Peptide mit der umgekehrten Sequenz sind ein schlechtes Substrat und werden aus diesem Grund größtenteils diskriminiert.

Abschließend kann man feststellen, daß die hemmende Wirkung von D-Aminosäuren durch den Ersatz von D-Alanin zustande kommt.

Analog zu D-Serin wirken auch andere D-Aminosäuren. Für D-Threonin, D-Leucin, D-Valin und D-Methionin konnte der Einbau in die Position 4 der Peptiduntereinheit gezeigt werden.

Die eingebauten D-Aminosäuren waren überwiegend C-terminal und führen damit zu einer verminderten Quervernetzung.

Es ist jedoch möglich, daß neben der Mureinbiosynthese noch andere Stoffwechselprozesse durch D-Aminosäuren gehemmt werden können. D-Serin führt z.B. zur Hemmung der Pantothensäurebiosynthese (Durham und Milligan 1962), da es nach den Untersuchungen von Grula und Grula (1963) ein starker Inhibitor der α -Decarboxylierung von Asparaginsäure ist.

Die Arbeit hat jedoch deutlich gemacht, daß die wachstumshemmende Wirkung von D-Aminosäuren gut durch die von uns erfaßten chemischen Veränderungen am Murein erklärt werden kann. Die Untersuchungsergebnisse zeigen aber, daß sich zwischen den einzelnen Organismen Unterschiede dahingehend ergeben, welcher Schritt vom Einbau in die Vorstufen bis zur Diskriminierung der "falschen" Vorstufen bei der Transpeptidierung die eigentliche Begrenzung darstellt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von D-Aminosäuren auf Biosynthese und Struktur des Mureins von acht Bakterienstämmen untersucht, deren Murein 4 verschiedenen Typen angehört.

Durch Isolierung der in Gegenwart von D-Serin gebildeten nukleotidaktivierten Mureinvorstufen konnte gezeigt werden, daß in den angereicherten Vorstufen das D-Alanin teilweise durch D-Serin ersetzt war.

Bei 3 Organismen konnten UDP-MurNac-Pentapeptide gefunden werden, in denen D-Serin in wechselndem Verhältnis in die Positionen 4 und 5 eingebaut wurde.

In 3 anderen Organismen wurden nur UDP-MurNac-Tetrapeptide angereichert, die entweder C-terminales D-Serin oder D-Alanin enthalten.

Mit Ausnahme von *M. lysodeikticus* wurden die serinhaltigen Vorstufen eingebaut, so daß das fertige Murein D-Serin in Position 4 enthält. Der Gehalt der Zellwand an D-Serin war niedriger als der der isolierten Vorstufengemische. Außerdem war das eingebaute D-Serin zu einem hohen Anteil C-terminal.

Es ist daher anzunehmen, daß die serinhaltigen Vorstufen sowohl beim Einbau in das Murein als auch bei der Quervernetzung diskriminiert werden und somit zu einem weniger quervernetzten und damit instabilen Murein führen.

Bei *M. lysodeikticus* liegt ein Sonderfall vor. Die eingebauten serinhaltigen Peptiduntereinheiten werden durch die Wirkung einer Amidase wieder abgespalten. Das fertige Murein hat alles D-Serin in Position 4 verloren und weist einen Überschuß von Aminoazuckern gegenüber Glutaminsäure auf.

Analoge Versuche mit D-Threonin, D-Leucin, D-Valin und D-Methionin bei *C. callunae* und *B. subtilis* ergeben ein ähnliches Bild. Auch diese D-Aminosäuren ersetzen das D-Alanin in der Peptiduntereinheit, sind bei der Hydrazinolyse überwiegend C-terminal und führen zu verminderter Quervernetzung.

Der Wirkungsmechanismus für D-Aminosäuren ist weitgehend identisch mit dem, der kürzlich für Glycin gezeigt wurde.

6. Literaturverzeichnis

- Bailey, J. L. (1962). Techniques in protein chemistry.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-
New York.
- Biochemisches Taschenbuch (1964). Herausgeg. von Prof.
Dr. H. M. Rauen, Springer-Verlag, Berlin-Göttin-
gen-Heidelberg-New York.
- Chatterjee, A. N. and H. R. Perkins (1966). Compounds
formed between nucleotides related to the bio-
synthesis of bacterial cell wall and vancomycin.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 489 - 494.
- Cummins, C. S. und Harris, H. (1956). The chemical
composition of the cell wall in some grampositi-
ve bacteria and its possible value as a taxono-
mic character. J. gen. Microbiol. 14, 583 - 600.
- Desnuelle, P., et A. Casal (1948). Sur la moindre
résistance a l'hydrolyse acide des liaisons
peptidiques situées a coté d'une fonction hydro-
xyle. Biochim. Biophys. Acta 2, 64 - 75.
- Dienes, L., J. H. Weinberger, and S. Madoff (1950).
The transformation of typhoid bacilli into
L-forms under various conditions. J. Bacteriol.
59, 755 - 764.
- Dienes, L. and P. C. Zamecnik (1952). Transformation
of bacteria into L-forms by amino acids. J. Bac-
teriol. 64, 770 - 771.

- Dubos, R. J. (1949). Toxic effects of DL-serine on virulent human tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* 60, 385.
- Durham, J. N. and R. Milligan (1962). A mechanism of growth inhibition by D-serine in a Flavobacterium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 7, 342 - 345.
- Fox, S. W., Fling M. and Bollenback, C. N. (1944). Inhibition of bacterial growth by D-leucine. *J. Biol. Chem.*, 155, 465 - 468.
- Fraenkel-Conrat, H. and Chun Ming Tsung (1967). Hydrazinolysis. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (ed.). *Methods in Enzymology* vol. XI, 151 - 155. Academic Press Inc., London and New York.
- Fung, P. H. and A. J. Winter (1968). Effects of penicillin and glycine on cell wall glycopeptides of the two varieties of *Vibrio fetus*. *J. Bacteriol.* 96, 1889 - 1894.
- Ghuysen, J. M., D. J. Tipper, and J. L. Strominger (1966). Enzymes that degrade bacterial cell walls. S. P. Colowick and N. O. Kaplan (ed.). *Methods in Enzymology* vol. VIII, 685 - 699. Academic Press Inc., London and New York.
- Ghuysen, J. M., E. Bricas, M. Lache, and M. Leyh-Boulle (1968). Structure of the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. III. Isolation of a new peptide dimer, N^{ϵ} -(L-alanyl- γ -(α -D-glutamyl-glycine))-L-lysyl-D-alanyl- N^{ϵ} -(L-alanyl- γ -(α -D-glutamyl-glycine))-L-lysyl-D-alanine. *Biochemistry* 7, 1450 - 1460.

- Ghuysen, J. M. and G. D. Shockman (1972). Bacterial cell surfaces. L. Leive (ed.), Publisher M. Dekker, New York, im Druck.
- Gordon J. and M. Gordon (1943). Involution forms of the genus *Vibrio* produced by glycine. J. Path. Bact. 55, 63 - 68.
- Grula, E. A. (1960). Cell division in a species of *Erwinia*. II. Inhibition of division by D-amino acids. J. Bacteriol. 80, 375 - 385.
- Grula, E. A. and M. M. Grula (1963). Inhibition in synthesis of β -alanine by D-serine. Biochim. Biophys. Acta 74, 776 - 778.
- Hammes, W. (1972). Die Wirkung von Glycine auf die Biosynthese des Mureins. Dissertation, TU München.
- Haimerl, G. (1970). Die Variabilität der Peptidbrücken des Mureins von *Staphylococcus aureus* Copenhagen in Abhängigkeit von der Nährbodenzusammensetzung. Zulassungsarbeit, TU München.
- Hartmann, H., und J. Heidberg (1964). Untersuchungen über die Kinetik der Spaltung von Di- und Tripeptiden. III. Mitteilung. Z. Naturforschg. 19b, 1095 - 1100.
- Hishinuma, F., K. Izaki, and H. Takahashi (1969). Effects of glycine and D-amino acids on growth of various microorganisms. Agr. Biol. Chem. 33, 1577 - 1586.

- Hladny, J. (1971). Mureintypen und deren taxonomische Bedeutung bei Streptokokken, Dissertation, TU München.
- Hughes, R. C., P. J. Tanner, and E. Stokes (1970). Cell-wall thickening in *Bacillus subtilis*. Comparison of thickened and normal walls. *Biochem. J.* 120, 159 - 170.
- Izaki, K. and J. L. Strominger (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIV. Purification and properties of two carboxypeptidases from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243, 3193 - 3201.
- Katz, W. and J. L. Strominger (1967). Structure of the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*. II. Study of the structure of peptides produced after lysis with the *Mycobacterium* enzyme. *Biochemistry*, 6, 930 - 937.
- Kobayashi, Y., M. Fling, and S. W. Fox (1948). Antipodal specificity in the inhibition of growth of *Escherichia coli* by amino acids. *J. Biol. Chem.* 174, 391 - 398.
- Lark, C., D. Bradley, and K. G. Lark (1963). Further studies on the incorporation of D-methionin into the bacterial cell wall. Its incorporation into the R-layer and the structural consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 78, 278 - 288.
- Lark, C. and K. G. Lark (1959). The effects of D-amino-acids on *Alcaligenes faecalis*. *Can. J. Microbiol.* 5, 369 - 379.

- Larson, D. M., D. C. Setsinger, and P. E. Waibel (1971).
 Procedure for determination of D-amino acids. *Anal. Biochem.* 39, 395 - 401.
- Leyh-Boulle, M., J. M. Ghuysen, R. Bonaly, M. Nieto, H. R. Perkins, K. H. Schleifer, and O. Kandler (1970).
 Substrate requirements of the *Streptomyces albus* G DD carboxypeptidase. *Biochemistry* 2, 2961 - 2970.
- Man, J. C. de, M. Rogosa, and M. E. Sharpe (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 23, 130 - 135.
- Mandelstam, P. and J. L. Strominger (1961). On the structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus* (Copenhagen). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 5, 466-471.
- Matsuda, T., S. Kotani, and K. Kato (1968). Structure of the cell walls of *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014. 1. Isolation and identification of the peptides released from cell wall peptidoglycans by *Streptomyces* L-3 Enzyme. *Biochem. Journal* 11, 111-126.
- Mirelman, D. and Sharon, N. (1966). Isolation and characterization of two disaccharide-peptides from lysozyme digests of *Micrococcus lysodeikticus* cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 237 - 243.
- Needleman, S. B. (1970). Protein sequence determination. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Neuhaus, F. C. (1962). the enzymatic sythesis of D-alanyl-D-alanine. I. Purification and properties of D-alanyl-D-alanine synthetase. *J. Biol. Chem.* 237, 778 - 786.

- Neuhaus, F. C. and W. G. Struve (1965). Enzymatic synthesis of analogs of the cell wall precursor. I. Kinetics and specificity of uridine diphospho-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-L-lysyl : D-alanyl-D-alanine ligase (adenosine diphosphate) from *Streptococcus faecalis* R. *Biochemistry* 4, 120-131.
- Park, J. T. (1958). Inhibition of cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus* by chemicals which cause accumulation of wall precursors. *Biochem. J.* 70, 2 P.
- Plapp R. und O. Kandler (1967 a). Die Aminosäuresequenz des Asparaginsäure enthaltenden Mureins von *Lactobacillus coryniformis* und *Lactobacillus cellobiosus*. *Z. Naturforsch.* 22 b, 1062 - 1067.
- Plapp R. and O. Kandler (1967 b). Identification of L-ornithine and D-aminosuccinyl ornithine in cell wall hydrolystes of *Lactobacillus cellobiosus*. *Nature* 213, 803 - 804.
- Perkins, H. R. (1968). Cell wall mucopeptide of *Corynebacterium insidiosum* and *Corynebacterium sepeidonicum*. *Biochem. J.* 110, 47 - 48 p.
- Rao, K. R. and H. A. Sober (1954). Preparation and properties of 2,4-dinitrophenyl-L-amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1328 - 1331.
- Reissig, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.* 217, 959-966.

- Rosenthal, S. and N. Sharon (1964). The use of Sephadex G-25 for the isolation of nucleotide sugar derivatives from *Micrococcus lysodeicticus*. *Biochim. Biophys. Acta* 83, 378 - 380.
- Salton, M. R. J. (1961). Studies of the bacterial cell wall.VIII. Reaction of walls with hydrazine and with fluoro-dinitrobenzene. *Biochim. Biophys. Acta* 52, 329 - 342.
- Schleifer, K. H. und O. Kandler (1967 a). Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von *Str. thermophilus* und *Str. faecalis*. *Arch. Mikrobiol.* 57, 335 - 364.
- Schleifer, K. H. and O. Kandler (1967 b). *Micrococcus lysodeikticus*: a new type of cross-linkage of the murein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 28, 965-971.
- Sheehan, J. C., D. Mania, S. Nakamura, J. A. Stock, and K. Maedu (1968). The structure of Telomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 462 - 470.
- Snell, E. E. and B. M. Guirard (1943). Some interrelationship of pyridoxine, alanine and glycine in their effect on certain lactic acid bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 29, 66.
- Stern, G. (1970). Der Einfluß von Lysin, Ornithin und Glycin auf die Mureinzusammensetzung verschiedener Milchsäurebakterien. Diplomarbeit, TU München.

- Strominger, J. L. and C. H. Birge (1965). Nucleotide accumulation in *Staphylococcus aureus* by glycine. *J. Bacteriol.* 89, 1124 - 1127.
- Takebe, I. (1965). Extent of cross linkage in the murein sacculus of *Escherichia coli* B cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* 101, 124 - 126.
- Tuttle, A. L. and H. Gest (1960). Induction of morphological aberrations in *Rhodospirillum rubrum* by D-amino acids. *J. Bacteriol.* 79, 213 - 216.
- Warth, A. D. and J. L. Strominger (1971). Structure of peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 10, 4349 - 4358.
- Weiss, N., R. Plapp und O. Kandler (1967). Die Aminosäuresequenz des DAP-haltigen Mureins von *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus inulinus*. *Archiv für Mikrobiologie* 58, 313 - 323.
- Welsch, M. (1958). Formation de protoplasts d'*Escherichia coli* sous l'influence de la glycine et d'autres acides amines. *Schweiz. Z. Allg. Path. Bact.* 21, 741 - 768.
- Welsch, M. and P. Osterrieth (1958). A comparative study of the transformation of gram-negative rods into "protoplasts" under the influence of penicillin and glycine. *A. van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 24, 257 - 272.
- Whitney, J. G. and E. A. Grula (1968): A major attachment site for D-serine in the cell wall mucopeptide of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta* 158, 124 - 129.

- Yaw, K. E. and J. C. Kakavas (1952). Studies on the effects of D-amino acids on *Brucella abortus*. J. Bacteriol. 63, 263 - 268.
- Young, F. E. (1965). Variation in the chemical composition of the cell walls of *Bacillus subtilis* during growth in different media. Nature 207, 104 - 105.

Lebenslauf

Am 25. 11. 1943 wurde ich, Bernhard Trippen, als Sohn des Kraftfahrers Otto Trippen und seiner Ehefrau Maria, geb. Künne, in Winterberg/NRW geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Neustenberg und anschließend das Johannes-Althusius Gymnasium in Bad Berleburg. Dort legte ich am 7.3.1963 die Reifeprüfung ab.

Von 1963 bis Herbst 1964 leistete ich den Grundwehrdienst in Diez an der Lahn.

Danach begann ich mit der Ausbildung als Apothekerpraktikant in der Engel-Apotheke in Arnsberg. Dort bestand ich im Herbst die pharmazeutische Vorprüfung.

Vom Wintersemester 1966/67 an studierte ich Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich 1970 das pharmazeutische Staatsexamen bestand. Meine Approbation als Apotheker erhielt ich im Herbst 1971.

Im Herbst 1970 begann ich unter der Anleitung von Prof. Dr. O. Kandler mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Während dieser Zeit hatte ich zunächst die Stelle einer wissenschaftlichen Hilfskraft inne. Ab Mai 1972 erhielt ich ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz.



